

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA

ANA MARIA PEREIRA DOS SANTOS SOUZA

INTERFERON ALFA 2B HUMANO RECOMBINANTE PEGUILADO:
ESTUDO DAS PROPOSTAS DE OBTENÇÃO DA MOLÉCULA
E SUA CARACTERIZAÇÃO

RIO DE JANEIRO
2010

Ana Maria Pereira dos Santos Souza

INTERFERON ALFA 2B HUMANO RECOMBINANTE PEGUILADO:
estudo das propostas de obtenção da molécula e sua caracterização

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.).

Orientadores:
Prof^a Maria Helena Rocha-Leão, D.Sc.
Prof. David Tabak, ph.D.

Rio de Janeiro

2010

S895i Souza, Ana Maria Pereira dos Santos.

Interferon alfa 2b humano recombinante peguilado: estudo das propostas de obtenção da molécula e sua caracterização/ Ana Maria Pereira dos Santos Souza. – 2010. xvi, 84 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

Orientadores: Maria Helena Miguez Rocha-Leão e David Tabak.

1. Dendrímero. 2. Interferon. 3. Peguilação. Teses. I. Rocha-Leão, Maria Helena Miguez (Orient.). II. Tabak, David (Orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química. IV. Título

CDD 571.9644

INTERFERON ALFA 2B HUMANO RECOMBINANTE PEGUILADO:
estudo das propostas de obtenção da molécula e sua caracterização

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.).

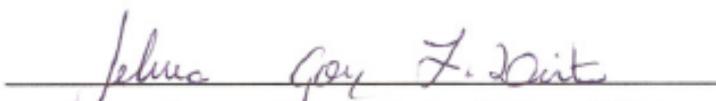
Aprovada em 15 DE SETEMBRO DE 2010



Prof^a Maria Helena Rocha-Leão, D.Sc. – UFRJ
(Orientadora – Presidente da Banca)



Prof. David Tabak, ph.D. – UFRJ
(Orientador)



Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc. - UFRJ



Alexandre Malta Rossi, D.Sc. – Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF)



Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc. - UFRJ

À Mirian, Vinicius e Maria Fernanda.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela saúde, e pelas oportunidades que sempre pôs em meu caminho.

À todos da minha família que em diversos momentos estiveram presentes com o suporte necessário à conclusão desta jornada.

Aos meus orientadores, Dra. Maria Helena e Dr. David Tabak pelo apoio e compreensão com meus “dilemas” durante a execução deste Trabalho.

À Tânia, pela paciência e pelos bons conselhos.

À Melissa, pela ajuda *on line* em momento complicado.

Ao Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) por fornecer estrutura para a realização dos experimentos e pela gentileza com que me receberam, permitindo que eu concluísse este Trabalho.

A todos de Bio-Manguinhos, pelas oportunidades de aprendizado.

Ao CIGB (*Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología*, Havana-Cuba) pela experiência.

*Compositor de destinos
Tambor de todos os ritmos
Tempo tempo tempo tempo
Entro num acordo contigo
Tempo tempo tempo tempo*

(Caetano Veloso – Oração ao Tempo)

RESUMO

SOUZA, Ana Maria P. dos Santos. **INTERFERON ALFA 2B HUMANO RECOMBINANTE PEGUILADO: estudo das propostas de obtenção da molécula e sua caracterização**. Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

Interferon alfa, pertence a uma classe de citocinas que ocorrem naturalmente no corpo humano e por sua atividade antiviral, antitumoral e imunorreguladora, tornou-se de grande interesse farmacêutico. É o principal medicamento contra hepatite C, etiologia responsável por 70% dos óbitos por hepatites no Brasil. Entretanto, tendo a via renal como principal rota de eliminação, apresenta curta meia-vida na corrente sanguínea, com picos de concentração sérica em 3 a 8 horas após a administração subcutânea ou intravenosa. Além de sua rápida eliminação, está exposta ao ataque de proteases. Tal fato acarreta na necessidade de administrações freqüentes do medicamento, reduzindo qualidade de vida dos pacientes e a eficiência do tratamento. Para contornar estes problemas, através de uma técnica denominada *peguição*, uma molécula da classe do polietilenoglicol (PEG) é quimicamente ligada à proteína, criando um efeito de proteção e de liberação controlada do medicamento, gerando assim o interferon peguilado. No mercado brasileiro existem dois fornecedores estrangeiros do medicamento peguilado. Bio-Manguinhos, juntamente com o CIGB (instituição cubana), estão em vias de produzir em escala industrial uma nova molécula peguilada. Através de caracterização por tamanho de partícula e perfil por espectroscopia UV, este trabalho comparou e verificou a existência de similaridade desta nova molécula com um dos produtos do mercado e sua eficácia potencial como proteína terapêutica de liberação controlada.

ABSTRACT

SOUZA, Ana Maria P. dos Santos. **INTERFERON ALFA 2B HUMANO RECOMBINANTE PEGUILADO: estudo das propostas de obtenção da molécula e sua caracterização**. Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

Interferon-alpha belongs to a group of cytokines naturally occurring in humans and thanks to its characteristic antiviral, antiproliferative and immunoregulatory, became a big pharmaceutical interest. Interferon-alpha is the main medicine used to treat hepatitis C, disease responsible for 70% of the obits by hepatitis in Brazil. However, the main route of elimination of interferon is via renal catabolism, with short half-life in human serum, with peak serum concentration occurring at 3-8 h following subcutaneous or intravenous administration. This protein suffers also degradation by proteases. This results in a treatment regimen that requires several doses of the drug, resulting in high impact on the quality of patients' life and restricts the success of the treatment. In order to avoid these problems by a technique named *pegylation*, a molecule of polyethylene glycol class (PEG) is linked to the protein, giving a protection and sustained release effect. This product is then named pegylated interferon. In the Brazilian market there are two international suppliers of this pegylated protein. Bio-Manguinhos and a Cuban institution (CIGB) are developing a new pegylated molecule to produce it in industrial scale. In this work this new molecule is characterized by particle size and UV spectroscopy and was verified its similarity with a standard from the market and its potential use as a sustained release therapeutically protein.

LISTA DE FIGURAS E EQUAÇÕES

<i>Figura</i>	<i>Título</i>	<i>Página</i>
1	Vírus da hepatite C	9
2	Representação do vírus da hepatite C	9
3	A - Organização e tradução do genoma do VHC B - Topologia das proteínas relativa à membrana do retículo endoplasmático	10
4	Histórico da evolução do VHC	12
5	Estrutura do IFN- α 2b humano recombinante	19
6	Esquema das etapas envolvidas no processo de descoberta de fármacos	32
7	Modelos de microcápsulas	37
8	Sítios de ligação do IFN- α no processo de peguilação	51
9	Ligante de PEG de 4 ramos com 48 kDa	61

<i>Equação</i>	<i>Título</i>	<i>Página</i>
1	Conjugação entre reativos PEG-benzotriazol e PEG-succinimidil empregada na obtenção do PegIntron®.	28
2	Reação de conjugação entre PEG-N-hidroxisuccinimidil ramificado e IFN- α -2b.	29
3	Conjugação entre reativo ramificado 40 kDa PEG-maleimida e a cisteína 86 (Cys86) do IFN- α -1b	30
4	Peguilação específica por enzima	31
5	Conjugação entre proteína e o PEG de quatro ramos	46
6	Conjugação entre IFN e PEG ativado de dois ramos	48
7	Reação geral entre amina e derivado NHS	49

LISTA DE GRÁFICOS, QUADROS E TABELAS

Gráfico	Título	Página
1	Casos de hepatite C no Brasil de 1999 a 2009	7
2	Percentual de óbitos por hepatites A, B e C (1999 a 2009)	8
3	Distribuição para a amostra de Bio-Manguinhos	55
4	Distribuição para a amostra de PegIntron	56
5	Distribuição para a amostra de PEG ativado de 48 kDa	57
6	Espectros de absorção no UV para as amostras de interferon peguilado	58

Quadro	Título	Página
1	Esquemas terapêuticos para hepatite C crônica	17
2	Proteínas peguiladas no mercado	26

Tabela	Título	Página
1	Interferons aprovados pelo FDA para o mercado norte americano	21
2	Interferons aprovados pelo EMEA para o mercado europeu	22
3	Interferons aprovados pela ANVISA para o mercado brasileiro	24
4	IFN beta registrados no Brasil	25
5	Benefícios e limitações dos sistemas de liberação controlada para IFN	42
6	Resultados de tamanho de partículas	58

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BioManguinhos	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos de Manguinhos
CIGB	<i>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología</i>
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DRX	Difração de raios X
EMEA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fiocruz	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
HCl	Ácido clorídrico
He	Hélio
HSA	<i>Human Serum Albumine</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IFA	Ingrediente farmacêutico ativo
IFN	Interferon
IFN-alfa	Interferon alfa
IFN-PEG	Interferon peguilado
IFN- α	Interferon alfa
IFN- β	Interferon beta
IFN- γ	Interferon gama
kDa	Quilodalton
LALLS	<i>Low Angle Laser Light Scattering</i>
M	Concentração molar
MALLS	Multi Angle Light Scattering
Ne	Neônio
NHS	N-hidroxisuccinimida
°C	Graus Celsius
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Patente de invenção
PNHV	Programa Nacional para Prevenção e o Controle das Hepatites Virais
RALLS	Right Angle Light Scattering

RNA	Ácido ribonucléico
RVS	Resposta viral sustentada
SC-PEG	Mpeg- succinimidil-carbamato
SS-PEG	mPEG-succinimidil-succinato
SUS	Sistema único de saúde
UV	Ultra-violeta
VHC	Vírus da hepatite C
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

Tópico	Pág.
1 APRESENTAÇÃO DO TRABALHO	1
1.1 INTRODUÇÃO	3
1.2 OBJETIVOS GERAIS	3
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
1.4 JUSTIFICATIVA	4
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 AS HEPTITES	5
2.2 O VÍRUS DA HEPATITE C (VHC)	7
2.2.1 Epidemiologia	7
2.2.2 Características estruturais	8
2.2.3 Genotipagem	11
2.2.4 Mecanismo de ação	11
2.2.5 Resposta imune	13
2.2.5.1 Resposta inata	13
2.2.5.2 Resposta celular	14
2.2.5.3 Resposta humoral	15
2.2.6 Tratamento	15
2.3 OS INTERFERONS	17
2.3.1 Definição	17
2.3.2 Classificação	17
2.3.2.1 Tipo I	18
2.3.2.2 Tipo II	18
2.3.2.3 Tipo III	18
2.4 O INTEFERON ALFA (IFN- α)	18
2.4.1 Propriedades	19
2.4.2 Propriedades farmacológicas e farmacocinéticas	19
2.4.3 Limitações no tratamento	20
2.4.4 Interferons registrados e suas aplicações	21
2.5 O INTERFERON PEGUILADO	25

2.5.1 A peguilação	25
2.5.2 Técnicas de peguilação	27
2.5.2.1 Modificação do grupo amino	27
2.5.2.2 Modificação do grupo tiol	29
2.5.2.3 Peguilação específica por enzimas ou proteção reversível	30
2.5.3 O interferon peguilado no mercado brasileiro	31
2.6 OUTROS MÉTODOS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA PARA O INTERFERON	35
2.6.1 Uso de proteínas de fusão	35
2.6.2 Micro e nano partículas	36
2.6.2.1 Atomização (<i>spray drying</i>)	37
2.6.2.2 Extrusão	37
2.6.2.3 Leito fluidizado	38
2.6.2.4 Coacervação	38
2.6.2.5 Liofilização	38
2.6.2.6 Secagem em tambor	38
2.6.2.7 Inclusão molecular	39
2.6.3 Lipossomas	40
2.6.4 Implantes	41
2.7 CARACTERIZAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS TERAPÊUTICOS	43
2.7.1 Técnicas de caracterização de polímeros	44
2.7.1.1 Espalhamento de luz laser de baixo ângulo (LALLS – <i>Low Angle Laser Light Scattering</i>)	44
2.7.1.2 Difração de raios X (DRX)	44
2.7.2.3 Espectroscopia UV	45
3 DESENVOLVIMENTO	46
3.1 O processo de conjugação proposto	47
3.2 Outros processos de conjugação registrados	47
3.2.1 Produção do Pegasys®	47
3.2.2 Produção do PegIntron®	49
3.3 Propriedades da proteína	50
3.4 Comparação entre os processos	51

4 MATERIAIS E MÉTODOS	52
4.1 Análise do tamanho de partícula	52
4.1.1 Equipamento e reagentes	52
4.1.2 Procedimento	53
4.2 Análise do espectro UV	53
4.2.2 Equipamento, materiais e reagentes	53
4.2.3 Procedimento	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 Tamanho de partícula	54
5.2 Espectro de absorção no ultra-violeta	58
6 CONCLUSÃO	62

1 APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

1.1 INTRODUÇÃO

Os Interferons (IFN) são proteínas que ocorrem naturalmente no corpo humano. São de alto valor terapêutico por sua atividade antiviral, antitumoral e imunorreguladora. A expressão do IFN alfa 2b humano recombinante em *Escherichia coli* a partir da tecnologia de DNA recombinante, conduziu à sua obtenção em grande escala com alto nível de pureza, permitindo sua aplicação de maneira eficaz contra diversas enfermidades (HERNANDEZ, *et al.*, 1998, CHEVALIEZ e PAWLOTSKY, 2007).

No Brasil, o Interferon alfa (IFN-alfa) é distribuído pelo Serviço Único de Saúde (SUS), com a denominação de “Alfainterferona 2b humana recombinante”. Este medicamento é fornecido pela Fundação Oswaldo Cruz, no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), sendo indicado para tratamento de infecções pelo papiloma vírus humano, hepatites virais B e C crônicas, AIDS, neoplasias do tecido hematopoiético e tumores sólidos (FIOCRUZ, sem data).

Dentre as indicações para o uso do IFN-alfa, a hepatite C é de grande relevância, pois se estima que 3% da população mundial esteja contaminada por este vírus e, por ser a mais freqüente etiologia associada às indicações de transplante hepático, caracteriza-se como um grave problema de saúde pública. Além disso, ainda não existe vacina contra este vírus (WHO, 2003; STARUSS, 2001).

O tratamento contra hepatite C crônica foi realizado inicialmente (em meados da década de 1980) em monoterapia, com emprego de IFN-alfa, por administração subcutânea. Este tratamento foi licenciado por demonstrar resposta viral sustentada após 24 a 48 semanas de curso do tratamento. Alguns anos depois, em 1991, somou-se a este tratamento a administração combinada do medicamento antiviral ribavirina, por via oral, elevando assim a resposta viral sustentada até 35-43% dos casos (MEYERS, *et al.*, 2003). Este é o tratamento atualmente aprovado pelo Ministério da Saúde no Brasil, com administrações diárias de IFN-alfa para hepatite C aguda e três vezes semanais para hepatite C crônica, juntamente com ribavirina, por via oral (QUIJANO e OTERO, 2006; BRASIL, 2007).

Entretanto, deve ser levado em consideração que restam ainda cerca de 60% de pacientes sem a obtenção de resposta viral sustentada. A razão para esta baixa eficiência está basicamente relacionada à curta meia-vida do Interferon na corrente sanguínea, sendo rapidamente metabolizado e eliminado pelos rins, o que leva a fortes flutuações em suas concentrações séricas.

Durante os momentos em que o IFN-alfa não está na circulação sanguínea, o vírus da hepatite C pode replicar-se e facilitar o desenvolvimento de resistência. Além disso, o IFN-alfa apresenta importantes efeitos adversos que, aliados à necessidade de aplicações freqüentes, comprometem a qualidade de vida do paciente e muitas vezes levam ao abandono do tratamento (QUIJANO; O TERO, 2006; BEZERRA; OLIVEIRA, 2007).

Para contornar estes problemas, foram desenvolvidas moléculas através de uma técnica denominada *peguilação*, a ligação covalente entre proteínas terapêuticas e usa polímero inerte da classe do polietilenoglicol (PEG) (ROBERTS; BENTLEY; HARRIS, 2002). A conjugação entre o polímero e a proteína leva a um aumento significativo da meia-vida do medicamento na corrente sanguínea, com necessidade de administrações menos freqüentes, aumentando a adesão dos pacientes ao tratamento e elevando os benefícios da terapia (BEZERRA; OLIVEIRA, 2007).

O Interferon peguilado (IFN-PEG) é também indicado pelo Ministério da Saúde, para alguns casos de hepatite crônica (BRASIL, 2007). Entretanto este medicamento ainda não é produzido no Brasil e necessita ser importado. O Interferon convencional já é distribuído pelo Sistema Único de Saúde (SUS), graças a um acordo de transferência de tecnologia entre a Fiocruz/Bio-Manguinhos e o *Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología*, o CIGB, localizado em Havana (Cuba). O Interferon peguilado, em uma proposta de estrutura molecular otimizada para a cadeia polimérica, está em vias de implementação no Brasil, num acordo inédito de desenvolvimento conjunto entre o CIGB e Bio-Manguinhos, cuja análise das etapas de obtenção propostas na patente cubana PI 0604313-A e a caracterização desta nova molécula terapêutica sintetizada a partir desta metodologia serão objeto de estudo deste Trabalho.

1.2 OBJETIVOS GERAIS

Analisar a proposta de obtenção e a estrutura do interferon peguilado da patente PI 0604313-A e sua viabilidade de produção industrial frente às técnicas de produção e as estruturas dos produtos similares atualmente disponíveis no mercado. Além disso, realizar a caracterização desta nova molécula proposta.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as técnicas de peguilação do interferon atualmente descritas na literatura e para a produção dos interferons peguilados disponíveis no mercado;
- Analisar outros processos de liberação controlada para o interferon e discuti-los frente ao método de peguilação;
- Caracterizar os interferons peguilados produzidos pela Schering (PegIntron®) e por Bio-Manguinhos pela determinação de tamanho de partícula e por espectro no UV;
- Avaliar a eficácia potencial dos materiais analisados frente aos resultados obtidos.

1.4 JUSTIFICATIVA

Os interferons alfa 2a ou 2b humano recombinante peguilados são medicamentos utilizados no tratamento das hepatites B e C crônicas, que foram desenvolvidos devido às limitações dos interferons convencionais. Atualmente, dois fornecedores estrangeiros (Schering Plough e Hoffman-La Roche) detêm a maior parte da sua produção mundial e o medicamento deve ser importado pelo Governo Federal para o tratamento dos pacientes no Brasil.

Esta importação representa um gasto expressivo para o governo brasileiro. Dentro do Programa Nacional de Hepatites Virais, já é fornecido o interferon convencional, que está em vias de nacionalização da produção por transferência de tecnologia.

Devido ao aumento da demanda tornou-se necessária a produção do interferon peguilado. Em continuidade ao processo base de nacionalização do interferon convencional, foi desenvolvida uma nova molécula de interferon peguilado, a ser obtida a partir do interferon convencional. Os processos de peguilação e purificação foram realizados num trabalho conjunto entre uma instituição de pesquisa e produção em Cuba e uma no Brasil. Este novo peguilado encontra-se atualmente em fase I de testes clínicos e representará autonomia no Brasil da produção desta proteína terapêutica de grande importância para a saúde pública no país e também uma plataforma de conhecimento para a obtenção de outras proteínas peguiladas.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AS HEPATITES

Hepatite é uma terminologia geral para definir qualquer inflamação no fígado e pode ser classificada nas seguintes categorias (FERREIRA e SILVEIRA, 2004; SILVA, P.; LIMA; SILVA, F., 2003):

- a) hepatites virais: vírus A, B, C, Delta, E, G, citomegalovírus, rubéola, herpes simples, febre amarela, varicela zoster, mononucleose, coxsackie e adenovírus;
- b) hepatite por protozoário: toxoplasmose;
- c) hepatites bacterianas: luética, leptospirótica, por listeria;
- d) hepatites por drogas: alcoólica, sulfas;
- e) hepatites por fungos: blastomicose, histoplasmose.

De todos estes agentes, os vírus A, B e C são os mais comuns e responsáveis pela grande maioria das formas agudas de infecção. Uma vez que os sintomas para todas as hepatites são os mesmos, o correto diagnóstico requer testes com anti-soros específicos (FERREIRA e SILVEIRA, 2004; SILVA *et al.*, 2003; WHO, 2002a).

A hepatite tipo A é provocada por um vírus RNA, classificado como da família *Picornavirus* e é transmitido pela via oral-fecal, sendo o homem o seu único reservatório de relevância epidemiológica. Esta infecção apresenta maior ocorrência em regiões com condições sanitárias precárias, sendo a mais freqüente hepatite viral aguda no mundo. O Brasil é considerado região de risco para a doença e estima-se que ocorram cerca de 130 novos casos por 100.000 habitantes ao ano (FERREIRA e SILVEIRA, 2004).

Relatos em diferentes países demonstraram que melhoria nas condições de saneamento reduz a prevalência da doença. Considerando que somente um sorotipo do vírus A foi descrito, o controle através de vacinação se torna facilitado. Já existem disponíveis no mercado vacinas contra a hepatite A, com 95% a 100% de eficácia. Entretanto, devido ao seu custo elevado, a vacinação não foi adotada no Brasil, cabendo a prevenção à melhoria das condições sanitárias (FERREIRA & SILVEIRA, 2004).

O vírus da hepatite B classifica-se como HepaDNA. De alta especificidade, tem o homem como seu reservatório natural. Pode ser transmitida por via parenteral, percutânea e por contato sexual. É transmitida também verticalmente, de mãe para feto (FERREIRA e SILVEIRA, 2004). Estima-se que cerca de 2 bilhões de pessoas ao redor do mundo tenham sido infectadas por este vírus; destas, 350 milhões vivem com a infecção crônica e que 600 mil pessoas venham a óbito a cada ano devido às conseqüências da hepatite B, sendo este vírus considerado 50 a 100 vezes mais infeccioso que o HIV. Esta enfermidade pode ser prevenida por meio de vacina, sendo esta já disponível desde 1982, apresentando 95% de eficácia (FERREIRA e SILVEIRA, 2004; WHO, 2002b). No Brasil, o Programa Nacional de Imunização do Ministério da Saúde iniciou a incorporação da vacina em 1992 e a partir de 1998 a vacina recombinante contra hepatite B foi incorporada ao programa de vacinação universal de menores de 1 ano em todo o país (LUNA *et al*, 2009).

Para pacientes acometidos pelo vírus em sua forma aguda não há tratamento específico, a não ser alimentação balanceada e reposição de fluidos. Para a forma crônica, o tratamento é efetuado por medicamentos, entre eles, o interferon e agentes antivirais. Entretanto, este tratamento possui alto custo e é menos acessível para a maioria dos países em desenvolvimento (WHO, 2004).

O vírus da hepatite C pertence ao gênero *Hepacivirus*, da família *Flaviridae*, sendo seu genoma constituído por uma fita simples de RNA. Humanos e chimpanzés são as únicas espécies documentadas como passíveis de infecção, desenvolvendo a doença de modo similar (FERREIRA e SILVEIRA, 2004; WHO, 2002a).

As formas de transmissão são as vias parenteral e sexual, e em 1975 já era sabido que a maioria dos casos de hepatite pós-transfusões de sangue estava associada a um vírus inicialmente identificado como “não A e não B”. O vírus foi clonado, identificado e nomeado como vírus da hepatite C somente em 1989, por Choo e colaboradores. É um vírus geneticamente variável, classificado em genótipos numerados de 1 a 6 (BEZERRA e OLIVEIRA, 2007; WHO, 2002).

Responsável por grande parte dos casos graves de hepatite, este vírus tem como característica a mutabilidade de seu genoma, com infecção crônica ocorrendo em 80% dos casos. Destes, 30 a 40% evoluem para cirrose hepática e os casos de câncer hepático entre os pacientes crônicos são de 3% ao ano (BRASIL, 2008).

2.2.0 VÍRUS DA HEPATITE C (VHC)

2.2.1 Epidemiologia

No Brasil, o número de casos de infecção por VHC, vem evoluindo significativamente, conforme apresentado no Gráfico 1, a seguir:

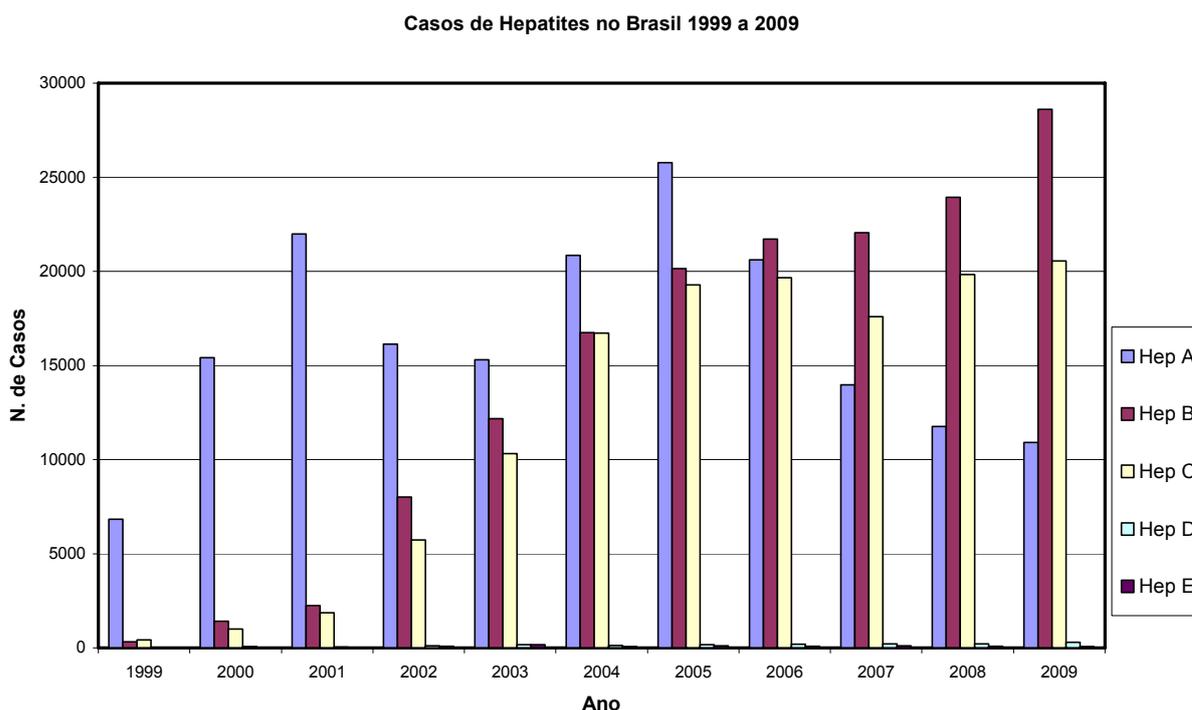


Gráfico 1 – Casos de hepatites no Brasil 1999 a 2009. Fonte: elaborado a partir de dados do Ministério da Saúde do Brasil, 2010

No gráfico acima, observa-se também significativa quantidade de casos de Hepatite B, mas vale lembrar que para essa etiologia existe vacina disponível e distribuída pelo Serviço Único de Saúde (SUS). Além disso, o número de casos registrados no gráfico é referente apenas aos casos notificados e diagnosticados com reativos específicos (BRASIL, 2010). Para as hepatites tipo D e E os números são inexpressivos. Entretanto, com relação a óbitos, os números percentuais apresentados para a hepatite C são significativamente maiores, como apresentado no Gráfico 2, a seguir:

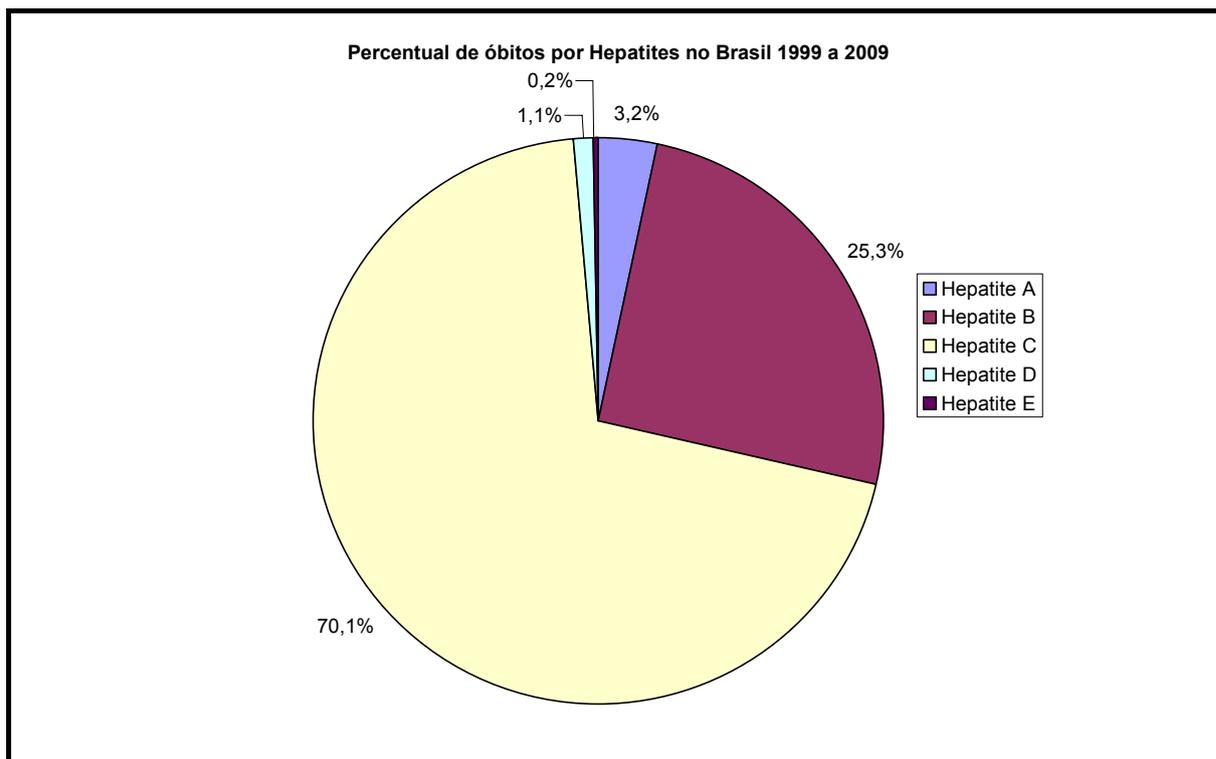


Gráfico 2 – Percentual de óbitos por hepatites no Brasil, 1999 a 2009. Fonte: elaborado a partir de dados do Ministério da Saúde do Brasil, 2010.

Os dados acima revelam a hepatite C como um significativo problema, de impacto pessoal, social e econômico (WHO, 2002a; BEZERRA e OLIVEIRA, 2007).

2.2.2 Características estruturais

Vírus da família *Flaviviridae*, com um gênero específico *Hepacivirus* (que agrupa os vírus C e G), pertence à mesma família de outros importantes patógenos humanos, como o vírus da dengue e da febre amarela (BARONE, 2008; KAYSER et al., 2005). Sendo um vírus RNA, o VHC (Figuras 1 e 2) é envelopado composto por uma cadeia única de RNA, de sentido positivo, com 55-65 nm de diâmetro e um genoma de 9,6 kilobase, que codifica uma poliproteína com cerca de 3000 aminoácidos (PORTO-ESPINOZA et al., 2006, BHOPALE e NANDA, 2005; PAWLOTSKY, 2004).

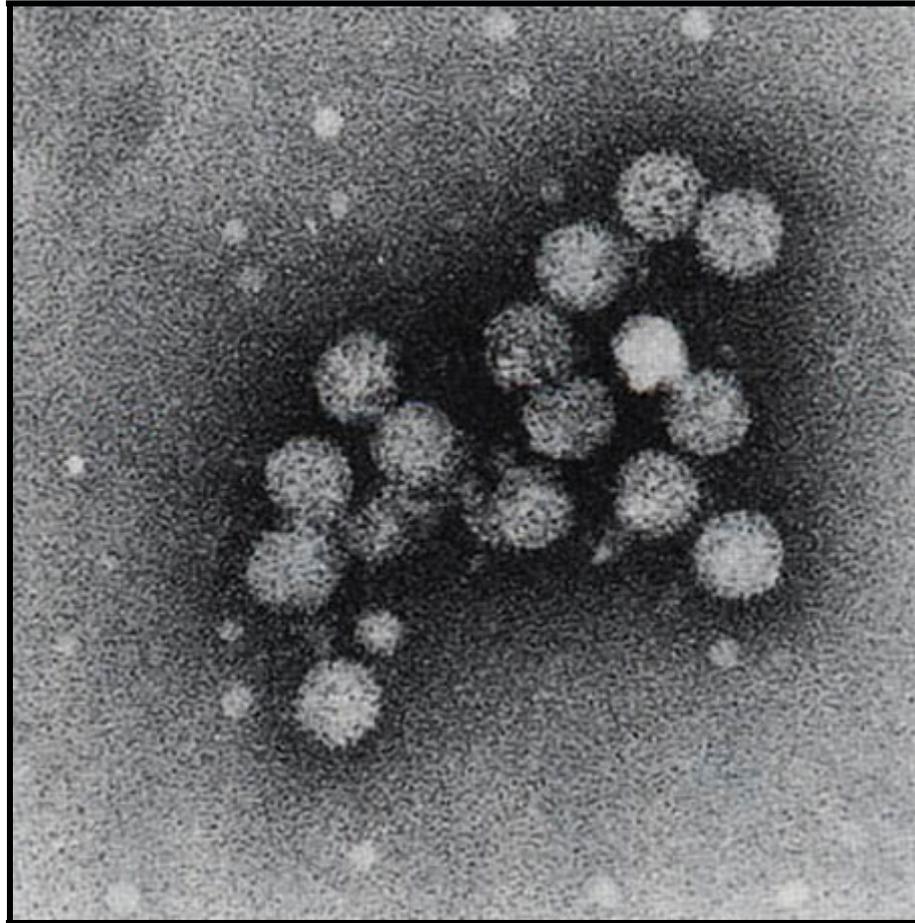


Figura 1 – Vírus da hepatite C.

Fonte: THE C. EVERETT KOOP INSTITUTE (sem data)

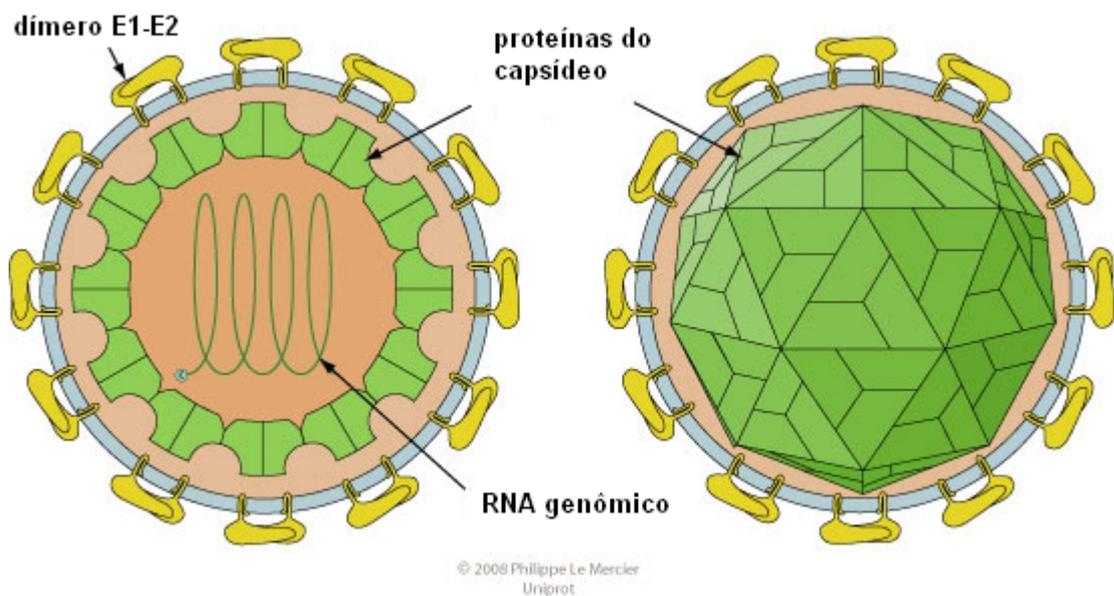


Figura 2 – Representação do vírus da hepatite C. Fonte: Viral Bioinformatics Resource Center VBRC.

O seu genoma é constituído por cerca de 10.000 nucleotídeos, em uma única estrutura de leitura aberta (ORF) (BARONE, 2008). As regiões não traduzidas (UTR) 5' e 3' possuem estruturas de RNA altamente conservadas, o que é essencial para a replicação viral (BHOPALE e NANDA, 2005). Sua tradução (Figura 2) ocorre por meio da atividade da enzima IRES (*internal ribozyme entry site*) no terminal 5', gerando uma extensa poliproteína, cuja estrutura subdivide-se nas proteínas estruturais, que são o “core” (C), proteína que forma o nucleocapsídeo viral e as glicoproteínas do envelope E1 e E2. P7 é uma pequena proteína hidrofílica. As proteínas não estruturais (NS) são NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a e NS5b. NS3 e NS5 possuem atividades enzimáticas essenciais para a replicação do VHC e são atualmente consideradas como possibilidades para desenvolvimento de novos agentes de combate ao vírus (TELLINGHUISEN et al., 2007; PORTO-ESPINOZA et al., 2006; BHOPALE e NANDA, 2005).

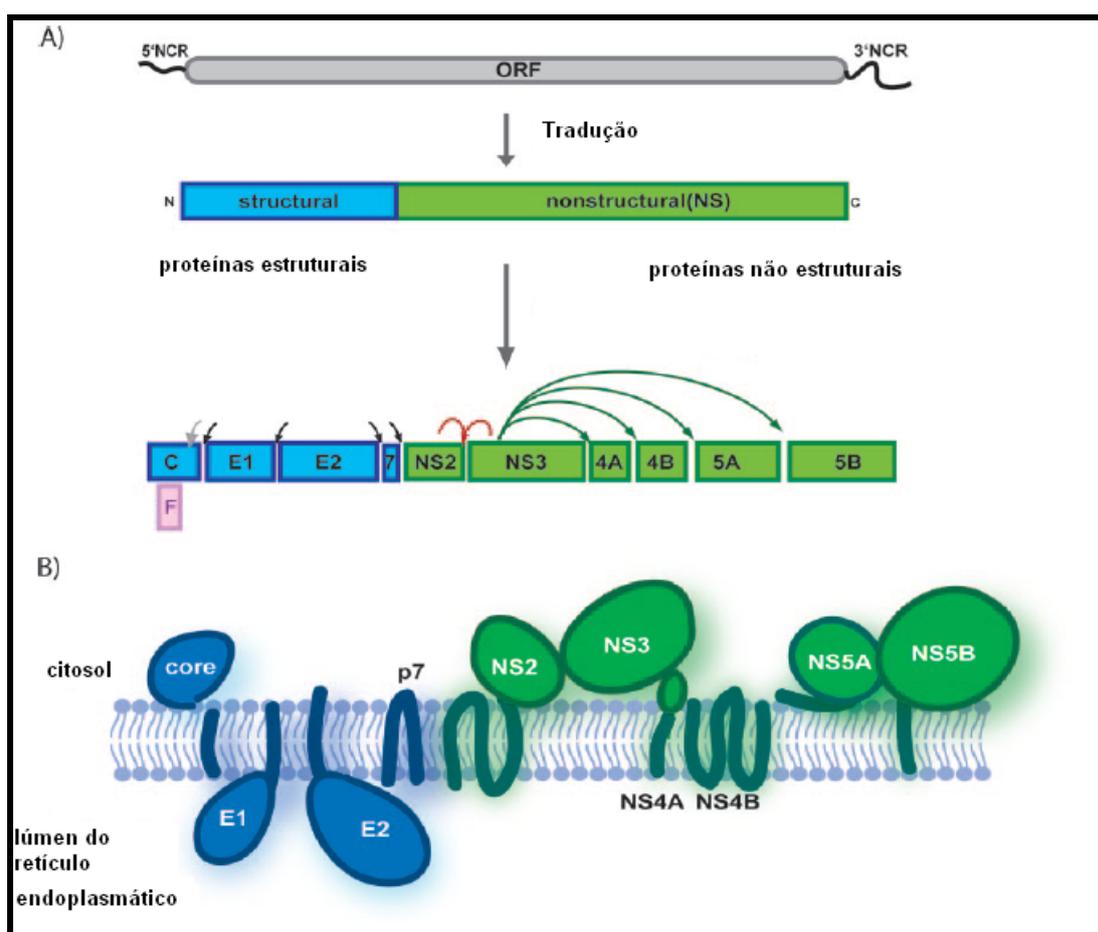


Figura 3 – (A) Organização e tradução do genoma do VHC (B) Topologia das proteínas relativa à membrana do retículo endoplasmático. Fonte: adaptado de TELLINGHUISEN, 2007.

2.2.3 Genotipagem

A genotipagem é ferramenta essencial que direciona a prática clínica e as decisões terapêuticas, pois estudos revelaram diferentes respostas ao tratamento de acordo com o genótipo do VHC apresentado pelo paciente (PERONE *et al.*, 2008). Análises filogenéticas de cepas de VHC isoladas em várias regiões do mundo levaram à identificação de seis grupos principais denominados genótipos, que foram numerados de 1 a 6 (PAWLOTSKY, 2003). Dentre os genótipos, as zonas de maior variação estão localizadas na porção aminoterminal da proteína E2, nas áreas especificadas como regiões hipervariáveis 1 e 2 (HVR1 e HVR2, localizadas em E1 e E2). Em cada genótipo foram identificados diversos subtipos, denominados como 1a, 1b, 2a, 2b, etc. (PORTO-ESPINOZA *et al.*, 2006).

O VHC, como outros vírus RNA, não circula em indivíduos infectados como uma população homogênea de partículas virais idênticas, mas sim em diversas formas genômicas, denominadas *quasispécies*, que são estreitamente relacionadas entre si, sendo ligeiramente diferentes na seqüência de suas bases nitrogenadas. Sua origem se deve a uma característica de seu RNA viral, que é incapaz de corrigir erros na incorporação de nucleotídeos durante a replicação, gerando mutações pontuais (PORTO-ESPINOZA *et al.*, 2006; PAWLOTSKY, 2003). Estas *quasispécies* conferem ao vírus uma significativa vantagem de sobrevivência, permitindo rápida seleção das espécies que melhor se adaptam a cada variação ambiental, provocada pelas interações com o hospedeiro por fatores externos, outras infecções, medicamentos ou tratamentos antivirais (PAWLOTSKY, 2003).

2.2.4 Mecanismo de ação

O VHC entra no hospedeiro principalmente através de exposição parenteral a sangue contaminados ou fluidos corpóreos (THITINAN e McCONVILLE, 2009; BHOPALE e NANDA, 2007). Os fatores mais associados à infecção são transfusão de sangue, uso de drogas injetáveis. Os fatores de risco são: uso inadequado de equipamentos médicos, comportamento sexual de risco, práticas culturais e sociais como circuncisões, uso de piercings e tatuagens. A transmissão da mãe para o feto

é pouco eficiente e não há relatos de transmissão por saliva (THITINAN e McCONVILLE, 2009).

A hepatite C aguda é geralmente assintomática, sendo raros os casos fulminantes ou severos. A maior complicação é a cronificação da enfermidade, o que ocorre em 50 a 80% dos casos (PAWLOTSKY, 2004; MEYERS *et al*, 2003). Este vírus RNA evade o sistema imune estabelecendo infecção crônica que pode levar à cirrose, câncer hepático e à morte (TELLINGHUISEN, 2007). Dos pacientes infectados, cerca de 30% chegam a eliminar o vírus espontaneamente, o que significa que existe um mecanismo imunológico capaz de eliminar completamente o vírus, que, se elucidado em detalhes, representará o caminho para a imunoterapia contra a hepatite C crônica (DIEPOLDER, 2009). A Figura 4, a seguir, é uma representação esquemática do histórico natural das infecções por VHC.

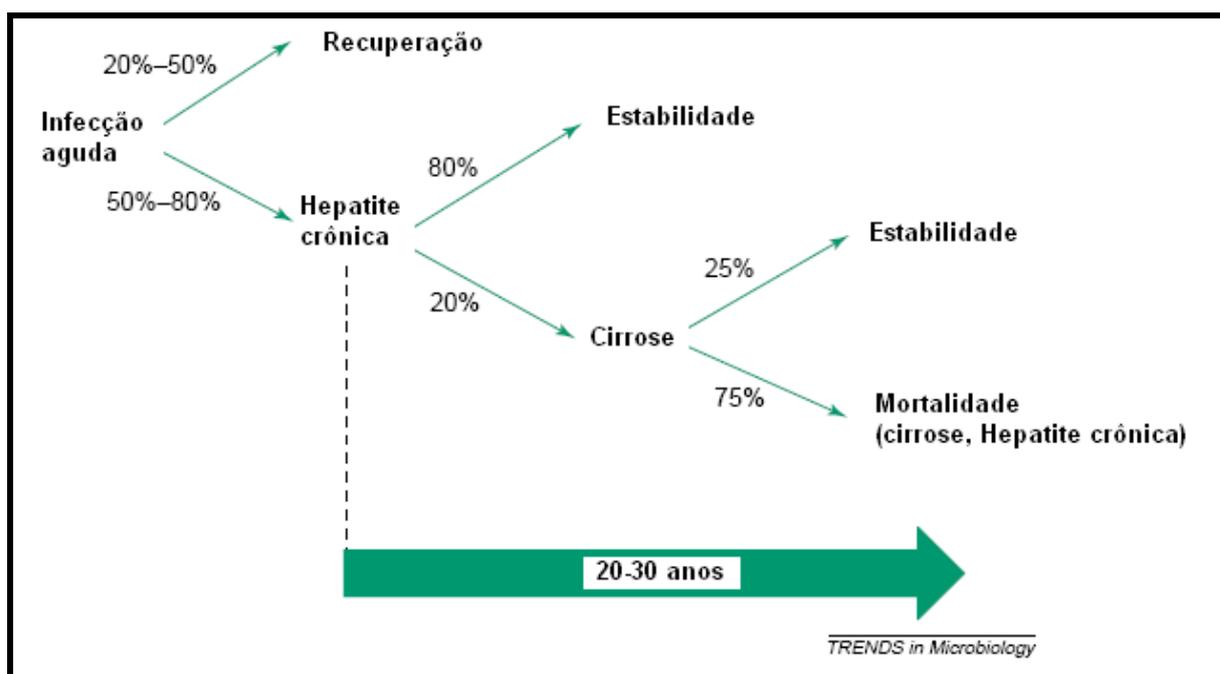


Figura 4 – Histórico da evolução do VHC. Fonte: adaptado de PAWLOTSKY, 2004.

Na corrente sanguínea, o ciclo de vida do VHC começa com o acoplamento de receptores específicos na célula viva. O complexo de proteínas de envelope E1-E2 realiza as primeiras interações com moléculas de superfície das células do hospedeiro, tais como glicosaminoglicanos, representando um papel no reconhecimento e tropismo celular. Após a interação de superfície, ocorre a endocitose, mediada por receptores em uma vesícula de baixo pH (VBRC, sem data;

TELLINGHUISEN et al., 2007; PAWLOTSKY, 2004). Quando o *core* viral atinge o interior da célula, a capa protéica se dissolve liberando seu RNA, que se agrega ao ribossoma celular e inicia a produção de RNA transcriptase. Nesta etapa do processo, observam-se alterações na função da célula, em alguns casos, o vírus estimula a reprodução celular, associando o VHC ao câncer hepático. O RNA viral gera um padrão que é copiado centenas e milhares de vezes. Inicia-se a produção de capsômeros, que são construídos ao redor do RNA em novas partículas virais. Os capsômeros constroem os capsídeos esféricos, envolvendo completamente o RNA. A partícula completa é denominada nucleocapsídeo (VBRC, sem data). O nucleocapsídeo adquire seu envelope no lúmen do retículo endoplasmático. As partículas são então exportadas e eliminadas pela rota secretória da célula e são eliminadas com o amadurecimento das proteínas de envelope como novos vírus. Este processo continua até a morte da célula por exaustão (VBRC, sem data PAWLOTSKY, 2004).

2.2.5 Resposta imune

Está desenvolvido no vírus da hepatite C um sistema de evasão e supressão do sistema imune, com recursos sofisticados, sendo a variabilidade genética e a alteração dos padrões de resposta imune - com a mudança contínua dos epítomos expostos à detecção - os fatores que mais contribuem para a geração de cronicidade e para a evasão às respostas inata, celular e humoral (PORTO-ESPINOZA, *et al.*, 2006).

2.2.5.1 Resposta inata

A infecção viral aguda aciona rapidamente a resposta imune não específica, como primeira linha de defesa, envolvendo principalmente a secreção de interferons do tipo I e ativação de células *natural killer* (NK), que são induzidas pela replicação do VHC, mas não são o suficiente para inibi-la (PAWLOTSKY, 2004). Estudos verificaram *in vitro* que algumas regiões virais bloqueiam a atividade antiviral dependente de interferon e acredita-se que alguns domínios das proteínas codificadas pelos genes NS5A e E2 se associam com a proteína quinase R (PKR), sintetizada durante a resposta antiviral interferon-dependente. A PKR atua

interrompendo a síntese celular de proteínas e, por conseguinte, a síntese de proteínas virais. A união das proteínas NS5A e E2 com a PKR aparentemente inibe o efeito antiviral da dita proteína. Além disso, descobriu-se que a proteína E2 inibe as células NK e a proteína do core pode interatuar e modular *in vitro* várias vias de transdução de sinal relacionadas com a resposta imune inata (PORTO-ESPINOZA, *et al*, 2006).

2.2.5.2 Resposta celular

Em linhas gerais, sabe-se que o VHC induz a uma resposta celular de baixa a moderada intensidade, o que está relacionado à cronicidade (PORTO-ESPINOZA, *et al*, 2006).

As células T CD8+, T CD4+ e a produção de anticorpos são induzidas em todos os pacientes imunocompetentes acometidos pela hepatite C aguda. A eliminação viral está associada com a ativação de genes que induzem a produção de interferons-gama (IFN- γ) e de genes envolvidos no processamento e apresentação de antígenos. Entretanto, este mecanismo de resposta demonstrou-se quantitativa e qualitativamente inadequado. Com a persistência do vírus, as células TCD4+ perdem a sua função, o que acarreta no declínio da produção de IFN- γ . As células TCD8+ específicas para o VHC tendem a ser multiespecíficas e policlonais e, devido a alta variabilidade do vírus, formações de mutações em *quasispécies* para escape às T CD8+ são comuns e acredita-se que sejam a razão principal da resistência viral (DIEPOLDER, 2009; PAWLOTSKY, 2004).

Sendo assim, a falha na coordenação entre as células TCD4+ e TCD8+ na maioria dos indivíduos para combater mutações virais e a exaustão celular, estão diretamente relacionadas à cronificação da enfermidade. Estes mecanismos devem ser devidamente elucidados antes que uma vacina eficaz possa ser desenvolvida (DIEPOLDER, 2009; PAWLOTSKY, 2004).

2.2.5.3 Resposta humoral

Com a habilidade de evadir o sistema imune inato, celular e à ação dos interferons, há ainda a produção de anticorpos anti-VHC de ação contra múltiplos epítomos, e são detectados geralmente de 7 a 31 semanas após a infecção, o que é significativamente demorado (PAWLOTSKY, 2004; VISO, 2007). Os anticorpos possuem como único alvo identificado a região hipervariável 1 (HVR1), uma cadeia de 27 aminoácidos localizada na posição N-terminal da glicoproteína de envelope E2. Entretanto, não foi confirmado se estes anticorpos possuem papel na eliminação do vírus. Além disso, foi sugerido que a variabilidade apresentada pela HVR1 pode gerar continuamente novas variantes do VHC capazes de escapar das respostas neutralizantes. Sugere-se também que estas variantes são formadas pelas propriedades conformacionais e físico-químicas altamente conservadas da HVR1, que pode induzir a formação de anticorpos que exercem reação cruzada com inúmeras variantes virais, que são geradas para eliminação do sítio de reconhecimento da resposta imune. Esta alta variabilidade genômica é outra razão para que não se possa afirmar que a produção de anticorpos tenha alguma atuação relevante no combate ao vírus (PAWLOTSKY, 2004).

2.2.6 Tratamento

Considerando que o vírus da hepatite C é altamente mutável, ainda não existe vacina disponível contra esta enfermidade, e nem profilaxia eficaz para pós-exposição (FERREIRA e SILVEIRA, 2004). O objetivo do tratamento da hepatite C crônica é prevenir as complicações posteriores decorrentes da infecção, o que significa eliminar RNA viral detectável do sangue, num ensaio onde o limite de detecção é ≤ 50 unidades internacionais por mililitro (UI/mL). O que se busca, portanto, é uma resposta viral sustentada (RVS), que se define como a ausência de RNA viral da hepatite C no sangue seis meses após o término da terapia. Estudos apresentam a RVS como um prognóstico favorável e equivalente à cura (THITINAN, 2009; CHEVALIEZ e PAWLOTSKI, 2007; QUIJANO e OTERO, 2006).

O desenvolvimento da imunoterapia atingiu recentemente a fase de estudos clínicos. A primeira vacinação terapêutica foi realizada com epítopos celulares CD4+ e CD8+ derivados de VHC, utilizando poli-arginina como adjuvante num tratamento em pacientes cuja resposta aos tratamentos tradicionais não foi satisfatória. Entretanto, somente poucos indivíduos apresentaram redução na carga viral. Em outro estudo, uma empresa suíça desenvolveu uma vacina de DNA, para tratamento de pacientes com hepatite C crônica e virgens de tratamento (nunca submetidos a outro tratamento) e apresentou alguns resultados promissores. Estes estudos revelam que a imunoterapia tem potencial e um melhor entendimento da imunopatogênese da hepatite C crônica deve ser alcançado para obtenção de avanços específicos (DIEPOLDER, 2009).

Dentre os tratamentos disponíveis no mercado, o primeiro a ser implementado foi a monoterapia com IFN-alfa, por via subcutânea ou intramuscular, que já era considerado como potencial tratamento para a hepatite C (antes denominada como “não A e não B”) em 1986. Foi licenciado em 1991 por demonstrar resposta viral sustentada (RVS) após 24 a 48 semanas de tratamento. O tratamento é descrito como doses de 3 milhões de unidades internacionais (3 MUI) em regime de 3 injeções semanais e por um período de 6 meses. Devido à baixa RVS apresentada (6 a 12% dos casos) pelos pacientes, o regime foi alterado para o período de 48 semanas (8 meses), para o tratamento de hepatite C crônica, mas os resultados de RVS permaneceram baixos (12 a 20%) (CHEVALIEZ e PAWLOTSKI, 2007). A RVS na monoterapia não é a mesma para todos os genótipos e observaram-se melhores resultados na monoterapia para tratamento de outros genótipos (28 a 42%) do que para o genótipo 1 (7 a 22%) (THITINAN e McCONVILLE, 2009). A fim de melhores resultados no tratamento, dois anos após o licenciamento do interferon, somou-se a essa terapia o uso do medicamento ribavirina (um agente antiviral análogo da guanosina de origem sintética) por via oral. Houve melhora nos resultados, que alcançaram uma média de 60% (BEZERRA e OLIVEIRA, 2007; QUIJANO e OTERO, 2006). Para tentar contornar a ainda insatisfatória eficácia no tratamento, devido às limitações do interferon, algumas moléculas de interferon modificadas, entre elas o interferon peguilado surgiram como alternativas (THITINAN e McCONVILLE, 2009).

No Brasil, os medicamentos adotados para o tratamento são o interferon convencional associado à ribavirina e o interferon peguilado associado à ribavirina, como apresentado no Quadro 1, a seguir:

Situação	Droga	Dose	Via	Duração
Hepatite C crônica (genótipo 1)	Peg + RBV	alfa 2a 180 µg/sem ou alfa 2b 1,5 µg/kg/sem	SC	48 semanas
		11-15 mg/kg/dia (800-1.200 mg em 2 tomadas)	VO	
Hepatite C crônica (genótipo 2 ou 3)	IFNc + RBV	3 MUI 3x/sem	SC	24 semanas
		11-15 mg/kg/dia (800-1.200 mg em 2 tomadas)	VO	

IFNc - interferon convencional; Peg - interferon peguilado; RBV - ribavirina

Quadro 1 – Esquemas terapêuticos para hepatite C crônica. Fonte: BRASIL, 2005
Legenda: SC: via sub-cutânea; VO: via oral

2.3 OS INTERFERONS

2.3.1 Definição

Dentre todas as citocinas conhecidas, o interferon foi a primeira a ser descrita em termos de atividade biológica, em 1957, por Isaacs e colaboradores (BILLIAU, 2006). Os interferons são glicoproteínas naturais produzidas pela maioria dos vertebrados em resposta a agentes infecciosos e células tumorais. Podem ser produzidos pelo sistema imune inato, adaptativo e também por fibroblastos e células epiteliais (CHEVALIEZ e PAWLOTSKI, 2007).

2.3.2 Classificação

A Sociedade Internacional para Pesquisa de Interferon e Citocinas dividiu os interferons em três classes principais, de acordo com sua origem e o tipo de receptor com o qual interagem (CHEVALIEZ e PAWLOTSKI, 2007).

2.3.2.1 Tipo I

Formam uma superfamília de citocinas produzidas pelo sistema imune inato. Pertencem a este tipo o IFN- α (com 13 subtipos) entre outros, tais como o IFN- β . Todos os subtipos de IFN- α são secretados por leucócitos, enquanto que IFN- β é também produzido por fibroblastos (CHEVALIEZ e PAWLOTSKI, 2007).

2.3.2.2 Tipo II

O único descrito até o momento é o IFN- γ , descoberto em 1965 e é produzido exclusivamente por células do sistema imune adaptativo, tais como células T e NK (*natural killers*), após estímulos ocorridos nas respostas iniciais do sistema imune inato (CHEVALIEZ e PAWLOTSKI, 2007).

2.3.2.3 Tipo III

Classificado e também denominado como interleucina 28/29 e como IFN- λ , apresenta atividades similares ao IFN, porém exerce sua atividade através de receptores mais complexos e distintos do IFN tipo I. Seus mecanismos de ação antiviral não estão completamente descritos, mas estudos observaram que pode ser produzido por monócitos macrófagos, células dendríticas e que sua produção é também estimulada pela ação de IFN- α . (ANK *et al.*, 2006).

2.4 INTERFERON ALFA (IFN- α)

IFN- α humanos, além do amplo espectro de ação antiviral, possuem também ação antiproliferativa e imunomodulatória sobre diversos tipos de células. Embora descobertos no final da década de 1950, tornaram-se disponíveis para obtenção em grande escala somente mais de duas décadas depois, com a expressão do IFN- α -2b humano recombinante em *Escherichia coli* a partir da tecnologia de DNA recombinante, com alto nível de pureza, permitindo sua aplicação de maneira eficaz contra diversas enfermidades. Diversos subtipos de IFN- α foram clonados, mas somente IFN- α -2a e 2b foram comercializados (CINDRIC *et al.*, 2006; HERNANDEZ, *et al.*, 1998; RADHAKRISHNAN *et al.*, 1996).

2.4.1 Propriedades

A proteína IFN- α é composta de 165 ou 166 aminoácidos, tal como todos os outros subtipos de IFN- α . Todas as espécies apresentam ainda duas pontes dissulfeto conservadas, localizadas entre as cisteínas (cys) cys1-cys98 e cys29-cys138 (Figura 5) (RADHAKRISHNAN *et al.*, 1996). Possui massa molecular de 19.400 Daltons (Da) (19,4 kDa) e seu ponto isoelétrico, determinado por focalização para a proteína recombinante, encontra-se entre 5,8 e 6,3 (WETZEL *et al.*, 1981; CINDRIC *et al.*, 2006).

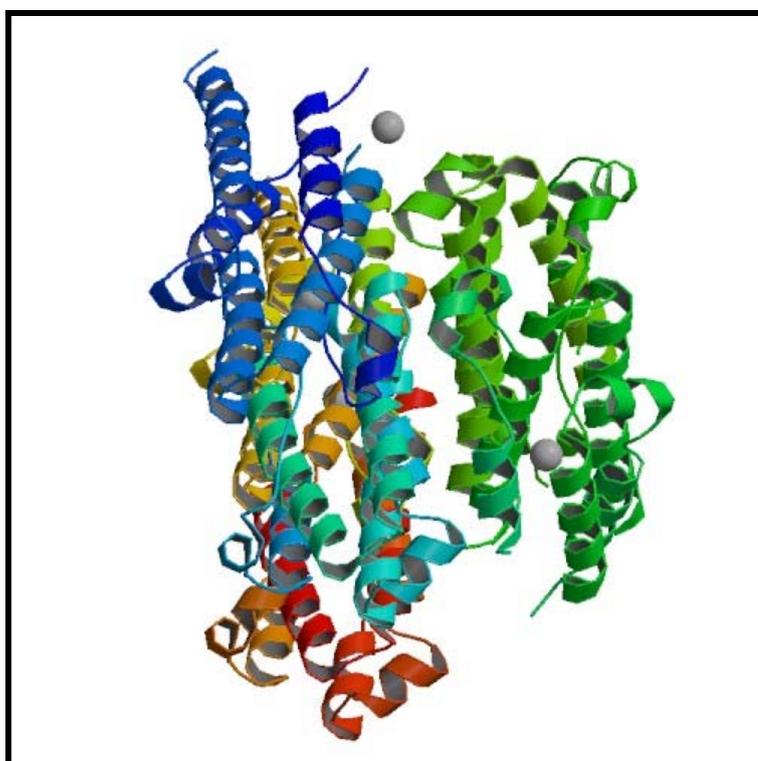


Figura 5 – Estrutura do IFN- α 2b humano recombinante. Fonte: PDB (1997)

2.4.2 Propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas

O IFN- α ativa genes celulares que resultam na produção de proteínas que conferem às células uma condição antiviral. De um modo geral, o mecanismo do sistema interferon é composto de duas etapas: a “indução/produção” e a “ação”. Ao entrar na célula, o vírus expõe seu material genético. No caso do VHC, o RNA segue para replicação e construção de novas partículas virais que deixam a

célula. O novo material genético formado envia um sinal para o núcleo da célula, levando ao processamento de genes de interferon e sua produção. O interferon produzido é eliminado pela célula e alcança a célula vizinha, onde é internalizado e inicia a sinalização para a produção de proteínas antivirais, paralisando a replicação do vírus (BILLIAU, 2006; KAYSER *et al.*, 2005).

Uma vez que são degradados pelo ácido gástrico e enzimas proteolíticas, os interferons devem ser administrados por via intramuscular ou subcutânea. São amplamente e rapidamente distribuídos pelos tecidos do corpo, com concentrações mais elevadas ocorrendo nas células esplênicas, nos rins, fígado e pulmões. Entretanto, estudos apresentam os rins como principal sítio de metabolismo do IFN, sendo esta a sua principal rota de eliminação. Uma quantidade considerável de IFN é eliminada pela urina, enquanto os metabolismos de excreção hepática e biliar são rotas minoritárias de eliminação. Com isso, a meia-vida do interferon no organismo é de 3 a 8 horas após a aplicação no paciente (THITINAN e McCONVILLE, 2009).

2.4.3 Limitações no tratamento

Todos os tratamentos atualmente disponíveis contra a hepatite C são baseados em formulações contendo IFN- α em monoterapia ou em combinação com ribavirina (THITINAN e McCONVILLE, 2009). Entretanto, devido à curta meia-vida, para atingir concentrações terapêuticas constantes e eficazes no sangue, o IFN- α deveria ser administrado várias vezes por dia, o que seria caro e incômodo (BEZERRA e OLIVEIRA, 2007). Para equilibrar tais problemas, a terapia exige injeções três vezes semanais e, em alguns casos, até diárias. Estudos de cinética viral mostraram que a administração de IFN- α a cada dois dias estava associada ao rebote viral entre as injeções, levando ao declínio do processo de eliminação viral em muitos pacientes e a adoção das injeções diárias não foi muito tolerada (CHEVALIEZ e PAWLOTSKI, 2007).

O tratamento com IFN- α apresenta vários efeitos colaterais tais como fraqueza, sonolência, perda de apetite, depressão, irritabilidade e ansiedade (THITINAN e McCONVILLE, 2009). Somando-se a esse quadro há ainda a

resposta insatisfatória, que é resultado da farmacocinética anteriormente descrita. Ainda assim, estudos apontam para tendência futura da permanência do IFN- α como antiviral, associado ou não a algum outro agente (THITINAN e McCONVILLE, 2009), o que justifica a persistência em aperfeiçoar o tratamento com esta proteína.

Um método encontrado para aumentar o tempo de circulação da molécula de IFN no sangue foi a ligação covalente da molécula protéica a cadeias de um polímero solúvel em água, o polietilenoglicol (PEG). Deste modo obteve-se o IFN peguilado, conferindo à proteína propriedades como maiores níveis de sustentabilidade no sangue, aumento da eficácia antiviral e maior conveniência ao paciente no tratamento (CHEVALIEZ e PAWLOTSKY, 2007; KOZLOWSKI e HARRIS, 2001).

2.4.4 Interferons registrados e suas aplicações

As Tabelas a seguir apresentam os interferons aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration* - mercado norte-americano), EMEA (*European Medicines Agency* - mercado europeu) e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - mercado brasileiro), bem como as indicações de uso para cada um deles:

Tabela 1: Interferons aprovados pelo FDA para o mercado norte americano

Nome	Ingrediente	Indicação	Empresa	Aprovação
Actimmune	IFN gama 1b	Granulomatose crônica Osteopetrose	Intermune Pharms	1999
Alferon N Injection	IFN alfa N3	Papiloma vírus humano (HPV)	Interferon Sciences	1989
Avonex	IFN beta 1a	Formas recidivantes de esclerose múltipla	Biogen	1996

(continuação)

Nome	Ingrediente	Indicação	Empresa	Aprovação
Betaseron	IFN beta 1b	Formas recidivantes de esclerose múltipla	Bayer Healthcare Pharms	1993
Extravia	IFN beta 1b	Formas recidivantes de esclerose múltipla	Novartis Pharms	2009
Infergen	Alfacon-1	Hepatite C crônica	Intermune Pharms	1997
Intron A	IFN alfa 2b	Hepatite C crônica	Schering	1986
Pegasys	IFN alfa peguilado	2a Hepatite C crônica	Hoffman-La Roche	2002
PegInterferon	IFN alfa peguilado ribavirina	2a e Hepatite C crônica	Hoffman-La Roche	2004
PegIntron	IFN alfa peguilado	2b Hepatite C crônica	Schering	2001
PegIntron/Rebetol Combo Pack	IFN alfa peguilado ribavirina	2b e Hepatite C crônica	Schering	2008
Rebif	IFN beta 1a	Formas recidivantes de esclerose múltipla	Serono INC (Merck Serono)	2002
Roferon A	IFN alfa 2a	Formas recidivantes de esclerose múltipla	Hoffman-La Roche	1986

Fonte: elaborado a partir de dados FDA

Tabela 2: Interferons aprovados pelo EMEA para o mercado europeu

Nome	Ingrediente	Indicação	Empresa	Aprovação
Alpheon	IFN alfa 2a	Hepatite C crônica	Bio Partners GmbH	Recusado em 2006 ⁽¹⁾
Avonex	IFN beta 1a	Esclerose múltipla	Biogen Indec Limited	1997
Betaferon	IFN beta 1b	Esclerose múltipla	Schering	1995
Extravia	IFN beta 1b	Esclerose múltipla	Novartis Europharm Limited	2008

(continuação)

Nome	Ingrediente	Indicação	Empresa	Aprovação
Infrgen	Alfacon-1	Hepatite C crônica	Astellas Pharma Europe BV	1999 e retirado em 2006 ⁽²⁾
Rebif	IFN beta 1a	Esclerose múltipla	Schering Plough Europe Limited	1998
Viraferon	IFN alfa 2b	Hepatite C crônica Hepatite B crônica	Schering Plough Europe	2000 e retirado em 2008 ⁽³⁾
Intron A	IFN alfa 2b	Leucemia; Hepatite C crônica; Leucemia de células T; Hepatite B crônica; Carcinoma folicular; Mieloma múltiplo	Schering Plough Europe	2000
Pegasys	IFN alfa 2a peguilado	Hepatite C crônica; Hepatite B crônica;	Roche Registration Ltd	2002
PegIntron	IFN alfa 2b peguilado	Hepatite C crônica	SP Europe	2000
ViraferonPeg	IFN alfa 2b peguilado	Hepatite C crônica	SP Europe	2000

Fonte: Elaborado a partir de dados do EMEA

Notas:

(1) Alpheon foi recusado pelo EMEA, sob as seguintes razões:

- ausência de dados suficientes de estabilidade;
- processo de produção do produto acabado não foi adequadamente validado;

- apresentou maiores efeitos colaterais que o similar Roferon A;
- os testes de potência não foram adequadamente validados.

(2) Retirado do mercado pelo próprio fabricante por razões comerciais.

(3) Retirado do mercado por razões comerciais, por ser idêntico ao Intron A.

Tabela 3: Interferons aprovados pela ANVISA para o mercado brasileiro

Nome	Ingrediente	Empresa	Fabricante
Roferon A	IFN alfa 2a	Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos SA	F. Hoffman La Roche (Suíça)
Interferon alfa 2a	IFN alfa 2a	Blausiegel Ind e Comércio LTDA	Shenyang Sunshine (China)
Heberon Alfa R	IFN alfa 2b	Cubanacan Comércio Internacional	CIGB (Cuba)
Intron A	IFN alfa 2b	Ind Química e Farmacêutica Schering Plough AS	Schering Plough (Irlanda)
Interferon alfa 2B HU R	IFN alfa 2b	Biosintética Farmacêutica LTDA	Biosidus (Argentina)
Kinnoferon 2 A	IFN alfa 2a	Lab Químico Farmacêutico Bergamo LTDA	Dong A Pharmaceutical (Coréia)
Blaufferon-B	IFN alfa 2b	Blausiegel Ind e Comércio LTDA	Laboratórios Pablo Cassará SRL (Argentina)
Interferon Alfa 2a Humano Recombinante	IFN alfa 2a	Chron Epigen Ind e Comércio LTDA	Shenyang Sunshine Pharmaceutical Co., LTD (China)
Pegasys	IFN alfa 2a peguilado	Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos SA	F. Hoffman La Roche
PegIntron	IFN alfa 2b peguilado	Ind Química e Farmacêutica Schering Plough AS	Schering Plough
Alfainterferona 2b humana recombinante	IFN alfa 2b	Bio-Manguinhos/FIOCRUZ	Bio-Manguinhos/FIOCRUZ

Fonte: elaborado a partir de dados da ANVISA (2005)

A Tabela 3 acima lista os produtos contendo IFN alfa, que comprovaram sua eficácia para tratamento das hepatites B e C.

A Tabela 4, a seguir lista os medicamentos contendo IFN beta registrados na ANVISA para tratamento de esclerose múltipla:

Tabela 4: IFN beta registrados no Brasil

<i>Produto</i>	<i>Empresa</i>
Avonex	Abbott
Betaferon	Schering do Brasil
Rebif	Serono
Interfer	Eurofarma
Imunokine Beta	Silvestre

Fonte: ANVISA (2003)

2.5 O INTERFERON PEGUILADO

2.5.1 A peguilação

Com a expansão do uso de proteínas e peptídeos para fins terapêuticos, graças aos avanços na engenharia genética e à capacidade de produção destes peptídeos em larga escala, foram evidenciados os problemas comuns entre eles, tais como curta meia-vida, surgimento de imunogenicidade, degradação proteolítica e baixa solubilidade. As estratégias encontradas para contornar estas características, melhorando a farmacocinética e a farmacodinâmica destes medicamentos, incluem a manipulação de seqüências de aminoácidos; a fusão ou conjugação a imunoglobulinas e proteínas, tais como a albumina; a incorporação da proteína a veículos para proteção e liberação controlada (lipossomas, micro-nano partículas, hidrogéis) e a conjugação a polímeros naturais ou sintéticos (VERONESE e PAUST, 2009; ROBERTS *et al*, 2002).

A *peguilação*, técnica de modificação de uma proteína pela ligação a uma ou mais cadeias de PEG, foi descrita pela primeira vez por Davies e Abuchowsky, no final da década de 1970, o que se tornou um marco, pois até então as proteínas – substâncias lábeis – não eram consideradas como passíveis de alterações tão significativas e que mantivessem sua atividade (VERONESE e PAUST, 2005). A comunidade científica se tornou familiarizada com as

otimizações associadas à peguilação, tais como a proteção de epítopos antigênicos, reduzindo seu reconhecimento pelo sistema imune e a degradação de proteínas por enzimas proteolíticas, além do aumento do tamanho aparente do polipeptídeo, reduzindo a filtração renal e alterando sua biodistribuição. Deste modo, a técnica foi adotada como alternativa para aumentar o tempo de circulação de proteínas farmacêuticas no sangue e logo se tornou grande o interesse em utilizá-la com o IFN- α (ROBERTS *et al.*, 2002; KOZLOWSKI e HARRIS, 2001). Dois laboratórios farmacêuticos foram os primeiros a disponibilizar formulações de IFN- α peguiladas: Schering, com o Peg-Intron®, e Hoffman-La Roche, com o Pegasys® (VERONESE e PAUST, 2005).

O Quadro 2 apresenta as proteínas peguiladas atualmente disponíveis no mercado:

Marca	Substância ativa	Indicação	Ano de aprovação
Adagen®	Adenosina deaminase	Imunodeficiência severa combinada	1990
Oncaspar®	Asparaginase	Leucemia	1994
Neulasta®	Fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF)	Neutropenia	2002
PegIntron®	Interferon α 2b	Hepatite C	2000
PAGASYS®	Interferon α 2a	Hepatite C	2002
Mircera®	Eritropoetina (EPO)	Anemia associada à doença renal crônica	2007
Somavert®	Antagonista do hormônio humano do crescimento	Acromegalia	2002
Cimzia®	Anti-Fator de Necrose Tumoral (Anti-TNF Fab')	Artrite reumatóide e doença de Chron	2008

Quadro 2 – Proteínas peguiladas no mercado. Fonte: VERONESE e PAUST, 2009

Essa técnica é vista atualmente como de contínuo interesse, estando muito bem documentada por diversos artigos e patentes e tornou-se a dominante para sistemas de liberação controlada de proteínas na indústria biotecnológica, cujas

vendas de proteínas terapêuticas peguiladas ultrapassam os quatro bilhões de dólares (VERONESE e HARRIS, 2008)

2.5.2 Técnicas de peguilação

Os fatores que contribuem para a alteração das propriedades de um polipeptídeo peguilado são: o número de cadeias de PEG ligadas à proteína; a massa molecular e a estrutura das cadeias de PEG; o local dos sítios de peguilação e a química utilizada para a conjugação (ROBERTS *et al.*, 2002).

Existem diversos procedimentos de modificação por conjugação química com possibilidades de se adequarem a diversas proteínas. Os grupos amino foram os primeiros alvos da peguilação, por reações de acilação ou alquilação. Mais recentemente, conjugação do PEG a grupos tiol, hidroxila ou amida também se tornaram possíveis por uso de diversos métodos químicos ou enzimáticos (VERONESE e PAUST, 2005).

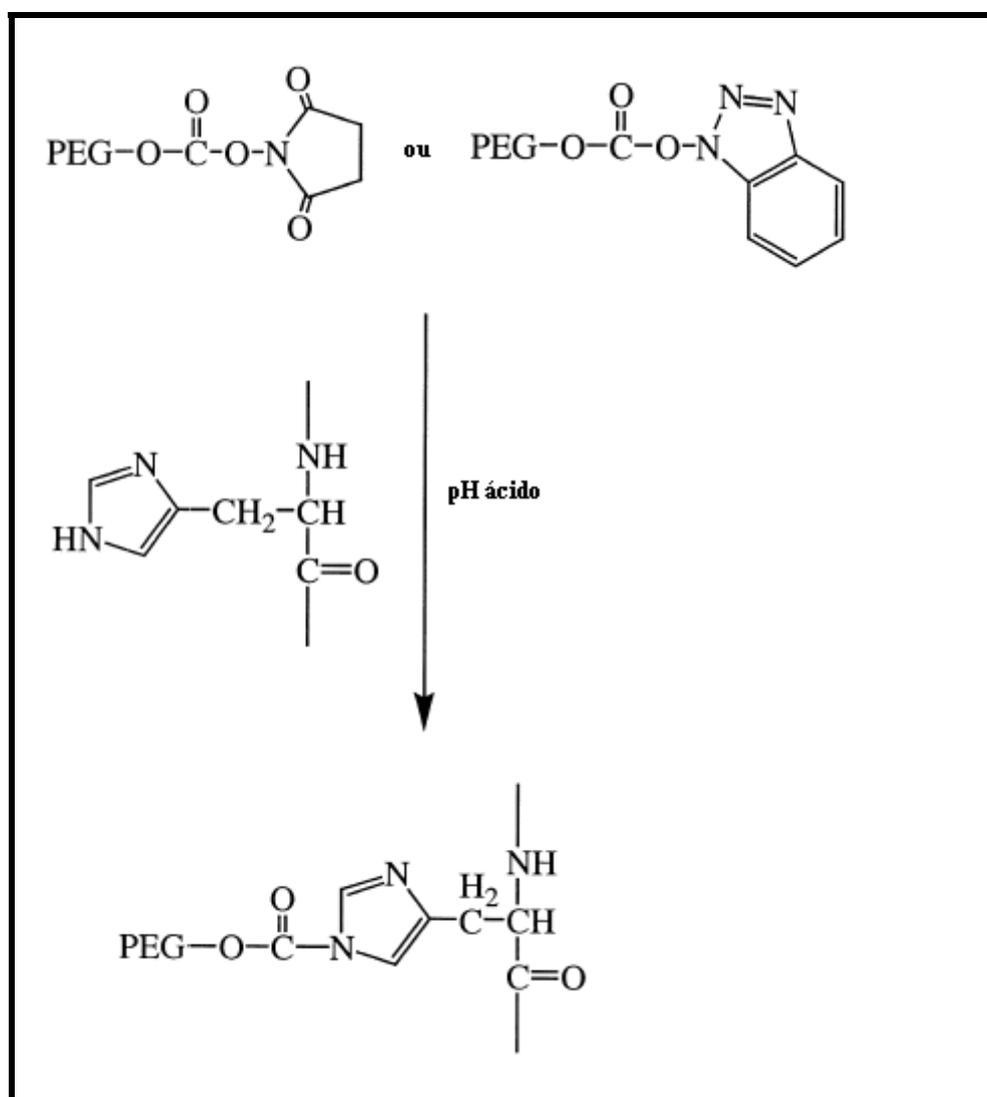
Para conjugar o PEG a uma proteína, antes é necessário ativar o polímero pela conversão da hidroxila terminal a algum grupamento capaz de reagir com grupos funcionais encontrados na superfície das proteínas, formando o reativo de PEG específico (KOZLOWSKI e HARRIS, 2001). As técnicas empregadas para a ativação e posterior conjugação são descritas a seguir.

2.5.2.1 Modificação do grupo amino

Os primeiros reativos ativados de PEG empregaram PEG linear com massas molares de 12.000 ou menos. Os mais utilizados foram os mPEG-succinimidil-succinato (SS-PEG) e succinimidil-carbonato (SC-PEG). Os reativos N-hidroxisuccinimidil foram usados principalmente para a conjugação com o grupo amino (α -amino N-terminal, ϵ -aminos em lisina ou grupos amino em histidina). Esta técnica foi empregada para a obtenção do PegIntron®, com a conjugação de SC-PEG ao IFN- α -2b (VERONESE e PAUST, 2009; ROBERTS e HARRIS, 2002). Embora esta técnica seja a modificação mais comum e a primeira escolha em qualquer projeto de conjugação, há formação de muitos isômeros, o que dificulta a posterior purificação. Entretanto, essa mistura de isômeros pode ser aprovada por

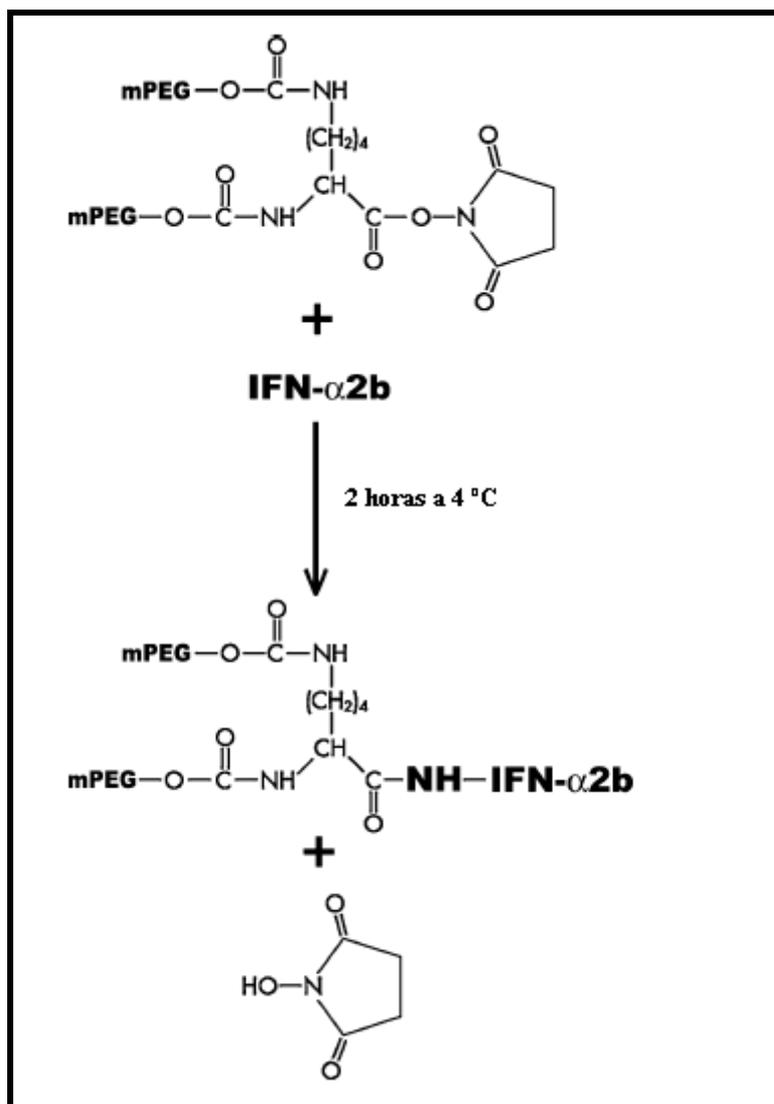
agências regulatórias, no caso da agência americana FDA se for comprovada a reprodutibilidade da reação. Este foi o caso do Oncaspar®. Com a implementação de maior rigidez nos controles de qualidade, a caracterização de cada isômero (quando possível) é compulsória, como foi o caso do Pegasys® e do PegIntron® (VERONESE e PAUST, 2005).

A Equação 1, a seguir ilustra a reação de obtenção do PegIntron®, através dos reativos PEG-benzotriazol ou PEG-succinimidil carbonato aos resíduos de histidina nas proteínas.



Equação 1 - Fonte: ROBERTS e HARRIS (2002).

A Equação 2, representa outro esquema de obtenção de IFN- α -2b peguilado. Nesta reação, grupos amino livres no IFN- α -2b reagem com o reativo PEG_{2,40K}, um reativo de duas ramificações e massa molar de 40 kDa. Quando o éster ramificado de 40 kDa de N-hidroxisuccinimida reage com a proteína, são formadas ligações amido entre ambas as macromoléculas (RAMON, *et al.*, 2005).

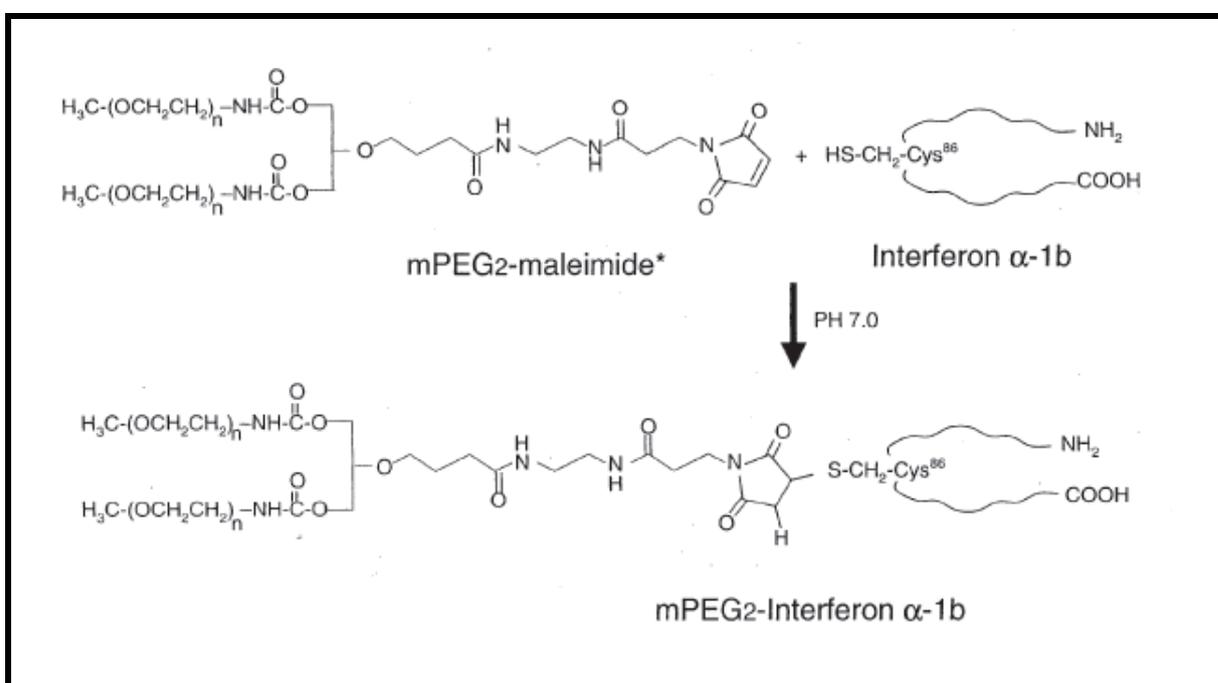


Equação 2 - Fonte: RAMON, *et al.* (2005).

2.5.2.2 Modificação do grupo tiol

A falta de especificidade é um limitante para a técnica de conjugação por grupo amino. Devido ao grande número de amins presentes em qualquer proteína, é também elevada a possibilidade de obtenção de múltiplos isômeros, por esta técnica que pode ser considerada randômica (VERONESE e PAUST, 2009). Como

proposta, a modificação do grupo tiol de cisteínas não envolvidas em pontes de dissulfeto é um método específico, pois cisteínas são raramente presentes em proteínas e peptídeos. Esta técnica se expandiu graças à engenharia genética, que permite a introdução de resíduos de cisteína em qualquer posição de uma seqüência peptídica, por substituição de um aminoácido não essencial (VERONESE e PAUST, 2005). Foi descrita para a peguilação de IFN- α -1b, através da ligação entre o reativo PEG-maleimida e a cisteína 86 (Cys86) da proteína que, segundo os autores, apresenta-se disponível para a conjugação com o grupo sulfidril (SHEN *et al.*, 2006), como apresentado na Equação 3:

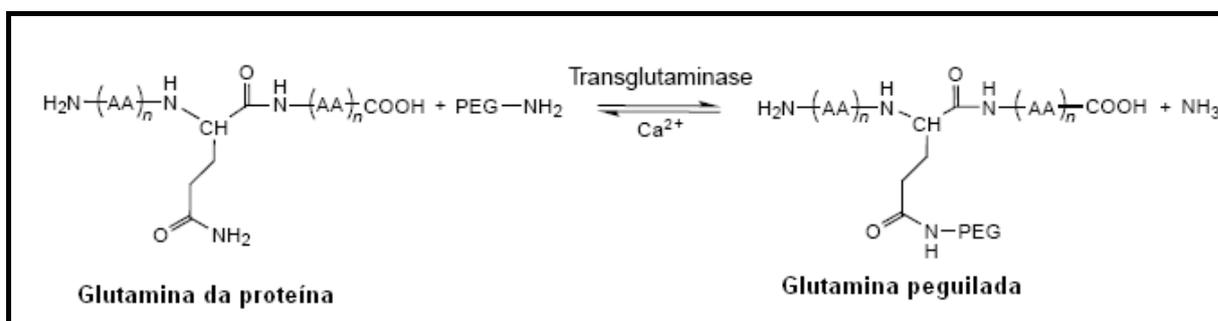


Equação 3 - Fonte: SHEN, *et al.* (2006).

2.5.2.3 Peguilação específica por enzimas ou proteção reversível

A conjugação mediada por enzimas foi proposta com a aplicação de enzimas, tais como glucoriltransferase e sialiltransferase, que foram empregadas para ligar uma unidade sialil-PEG a resíduos de serina ou treonina. Esta metodologia tenta mimetizar a glicosilação natural de proteínas, mostrando que o PEG pode substituir os glicanos das modificações pós-transducionais das proteínas. Este método despertou interesse recentemente por ter demonstrado que pode ser um método de

alta especificidade (VERONESE e PAUST, 2009). Diversas enzimas que ocorrem naturalmente reconhecem glutamina como substrato, são as transglutaminases. Pesquisas demonstraram que glutaminas em proteínas podem ser substratos destas enzimas, se uma unidade amino PEG é usada como doador nucleofílico. Através da reação de transglutaminação a enzima liga o PEG a proteína a nível de resíduos de glutamina. A Equação 4 a seguir, é uma representação de peguilação conduzida pela transglutaminase, com reação seletiva entre o reativo PEG-amino e o resíduo de glutamina presente na proteína (VERONESE e PAUST, 2005).



Equação 4 - Fonte: adaptado de VERONESE e PAUST (2005).

2.5.3 O Interferon peguilado no mercado brasileiro

Tendo em vista que as hepatites virais são um grave problema de saúde pública no mundo e no Brasil, o Ministério da Saúde do Brasil criou em fevereiro de 2002 o Programa Nacional para Prevenção e o Controle das Hepatites Virais (PNHV), a fim de promover a vigilância epidemiológica e garantir ações gerenciais em todos os níveis para que os pacientes tenham acesso aos serviços de saúde (BRASIL, 2003; BRASIL, sem data). Sendo assim, a fim de abastecer o mercado brasileiro com o medicamento interferon o Ministério da Saúde, através de um acordo de transferência de tecnologia assinado em 2004 entre Fiocruz/Bio-Manguinhos e a Instituição cubana CIGB (*Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología*), o medicamento é fornecido pela instituição cubana sob a forma de ingrediente farmacêutico ativo (IFA). O IFA é formulado, envasado e embalado em Bio-Manguinhos, de onde é distribuído para os postos do Serviço Único de Saúde (SUS). Em 2006, foram iniciadas as obras para a construção da planta de produção

deste medicamento no Brasil, e o início da produção do interferon nacional está previsto para 2011.

Com a verificação da eficácia superior do interferon peguilado comparada à do interferon convencional e com o aumento de sua demanda, um acordo inédito se estabeleceu em 2008 entre o CIGB e Bio-Manguinhos para o desenvolvimento conjunto do medicamento peguilado, capacitando simultaneamente as duas instituições na produção deste novo medicamento. O acordo de desenvolvimento conjunto foi assinado e averbado do Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) em 2008.

A partir deste acordo, grupos de diversas especialidades foram mobilizados para tornar realidade a produção do interferon peguilado brasileiro-cubano e este acordo está permitindo a vivência nas etapas do desenvolvimento de um medicamento, como apresentado na Figura 6 :

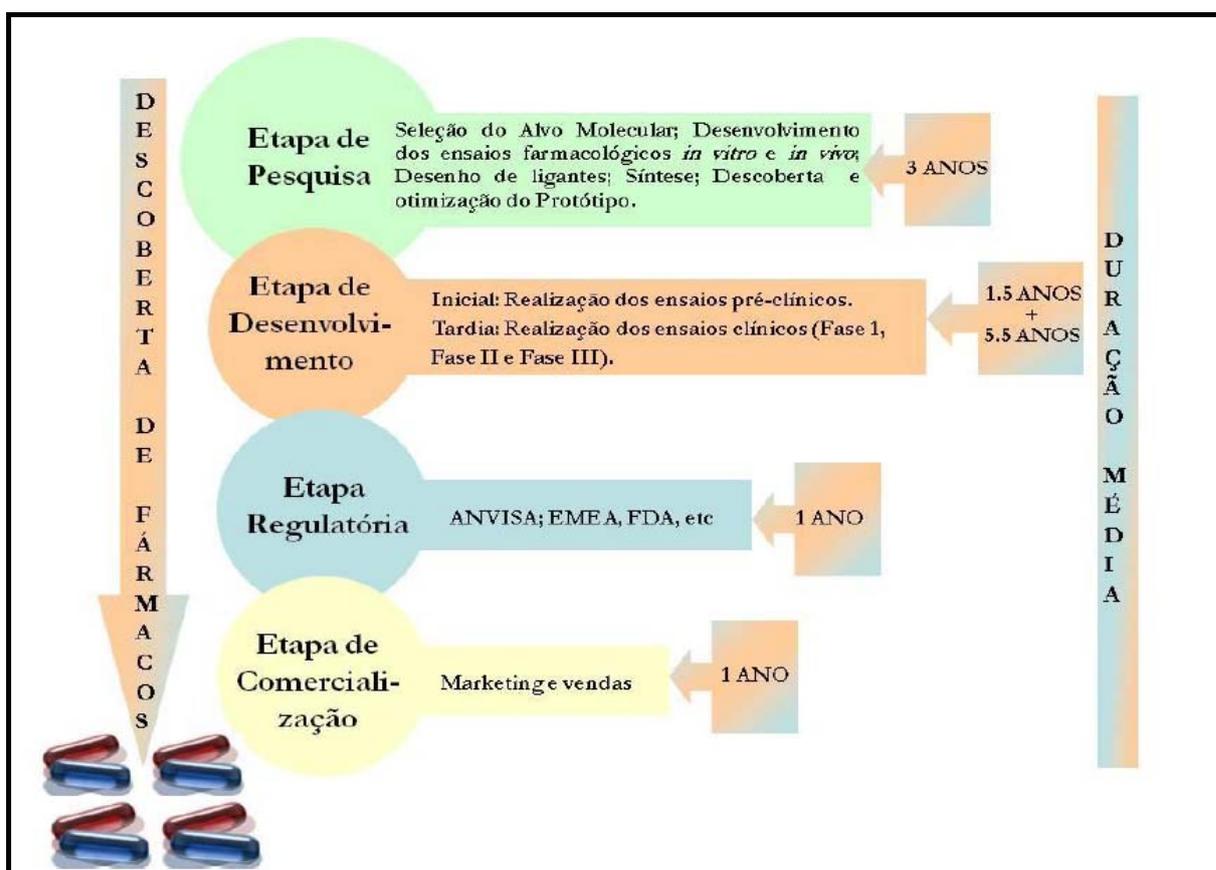


Figura 6: esquema das etapas envolvidas no processo de descoberta de fármacos. Fonte: ROCCO *et al*, 2010.

As etapas de pesquisa e de testes pré-clínicos em animais já foram realizadas e o produto se encontra em fase I de testes clínicos, e todas as fases estão descritas abaixo.

- Fase I: fase na qual os pesquisadores testam o medicamento em um pequeno grupo de pessoas (20 a 30) para avaliar sua segurança, determinar a dosagem e identificar os efeitos colaterais;
- Fase II: o medicamento é administrado em um grupo maior de pessoas (100 a 300) para verificação de sua eficiência e avaliações adicionais de segurança;
- Fase III: é realizada avaliação com grupos maiores (1000 a 3000 pessoas), para confirmação da eficiência, monitoração dos efeitos colaterais, comparação com outros medicamentos similares e coleta de informações que irão permitir que o medicamento seja utilizado com segurança;
- Fase IV: estudos pós liberação do produto para o mercado, que fornecem informações adicionais do medicamento, incluindo riscos, benefícios e condição ideal de utilização (CLINICALTRIALS.GOV, 2007)

De um modo geral dentre 30 a 50 candidatos a medicamentos nos testes toxicológicos e de fase I, apenas 1 a 3 candidatos chegam à fase III. Embora possa haver problemas ligados diretamente a segurança e eficácia, uma forte razão é a existência de uma lacuna entre os grupos de pesquisa e de engenharia e produção. Para que um candidato a medicamento percorra todos os estágios do desenvolvimento, incluindo as fases I, II, III, escalonamento e produção para o mercado, uma equipe multidisciplinar em bem integrada é fundamental, com interação entre os princípios de engenharia e práticas de pesquisa e desenvolvimento farmacêutico (WU *et al*, 2007).

Tal interação vem ocorrendo para a obtenção do interferon peguilado, em junho de 2008, tiveram início em Cuba, no CIGB, os experimentos de desenvolvimento do novo ativado de polietilenoglicol de 48 kDa, que se trata de uma nova proposta de ligante com 4 ramos e massa molar de 48 kDa, bem como os experimentos de conjugação deste ativado à molécula de interferon convencional.

Entre outubro e novembro de 2009 foi realizada a produção de lotes em escala piloto nos moldes dos resultados satisfatórios dos experimentos de desenvolvimento do processo, que foi desenhado em acordo entre as equipes de desenvolvimento e produção, em acordo com as Boas Práticas de Laboratório e as Boas Práticas de Fabricação. Com os avanços e as aprovações nas etapas seguintes dos testes clínicos, a produção desta molécula será nacionalizada e o produto poderá ser distribuído aos pacientes pelo SUS.

2.6 OUTROS MÉTODOS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA PARA O INTERFERON

A peguilação, embora possa aperfeiçoar a bioatividade da proteína nativa pela redução da taxa de eliminação do organismo, ao mesmo tempo pode reduzir a mesma atividade por impedimento estérico. Deve ser observado o equilíbrio entre o tamanho da cadeia polimérica a ser conjugada e seu efeito sobre a atividade antiviral a que o medicamento se propõe (CALICETI, 2004).

Como alternativa a peguilação e suas possíveis limitações, outros métodos de liberação controlada do interferon na corrente sanguínea foram estudados, buscando aperfeiçoar a farmacocinética e a farmacodinâmica, resultando na menor frequência possível de aplicações do medicamento.

2.6.1 Uso de proteínas de fusão (modificação genética)

Usualmente, peptídeos são conjugados a uma proteína carreadora a fim de aumentar sua imunogenicidade e retardar a degradação. A proteína formada é geneticamente modificada, através de rearranjo cromossômico de dois segmentos de DNA, em que dois genes diferentes são fundidos. Esta fusão dá origem a um novo gene, que codifica uma proteína de fusão ou quimera.

Para uso como proteína de fusão, a albumina sérica humana foi reconhecida como candidata ideal por ser a mais prevalente na ocorrência natural no sangue humano, possuir meia-vida na circulação de 19 dias e por apresentar pouca função enzimática e imunológica. Por estas propriedades, pesquisas confirmaram que proteínas terapêuticas com limitações de estabilidade, tais como o IFN, geneticamente fundidas a albumina apresentaram maior meia-vida na circulação e estabilidade mais elevada (BLAIRE, *et al.*, 2002; THITINAN e McCONVILLE, 2009)

Albumina foi utilizada para a produção do Albuferon® (ZALBIN™), produzido pela Human Genome Sciences, uma proteína de 85,7 kDa constituída do IFN- α 2b geneticamente fundido a albumina sérica humana (HSA) e está em fase avançada de testes clínicos (THITINAN e McCONVILLE, 2009). Ainda neste setor, foi realizado outro estudo com uma proteína recombinante de fusão utilizando IFN- α -2b e albumina sérica humana (HSA), gerando a rHSA/IFN α 2b, para o qual empregou-se

Pichia pastoris como sistema de expressão. Testes preliminares com esta proteína recombinante mostraram resultados satisfatórios e comparáveis ao IFN convencional e IFN-PEG (HUANG, *et al.*, 2007).

A desvantagem desta metodologia está no desafio tecnológico da produção em larga escala de proteína geneticamente modificada para uso parenteral humano (THITINAN e McCONVILLE, 2009). Segundo informações mais recentes, o FDA manifestou-se contra a aprovação do Albuferon®, alegando não ser suficientemente favorável a razão risco/benefício, levando-se em consideração a potência inferior do medicamento quando administrado em doses menos freqüentes e seu já observado potencial para graves efeitos colaterais no trato respiratório (HUMAN GENOME SCIENCES, 2010).

2.6.2 Micro e nano partículas

A microencapsulação utiliza matrizes poliméricas biodegradáveis e define-se como técnica de empacotamento de materiais em cápsulas poliméricas seláveis, protegendo o dito material de interesse de condições ambientais adversas, liberando seu conteúdo em velocidade controlada e em condições específicas. O produto obtido por este processo apresenta diferentes morfologias e estruturas internas. Quando possuem dimensão abaixo de 100 nanômetros, são denominadas nanopartículas, nanocápsulas ou nanoesferas (SAEZ, *et al.*, 2008; SAEZ; HERNÁNDEZ; PENICHE, 2007; REIS, 2009). Nas duas últimas décadas as microesferas vêm sendo estudadas para a liberação controlada de proteínas e peptídeos. De um modo geral, o medicamento é distribuído através de uma matriz polimérica e liberado por difusão através da matriz ou degradação do polímero com liberação das partículas (SAEZ; HERNÁNDEZ; PENICHE, 2007; AZEREDO, 2005)..

As microcápsulas (ou microesferas) podem ser fabricadas de acordo com os modelos apresentados na Figura 6, a seguir:

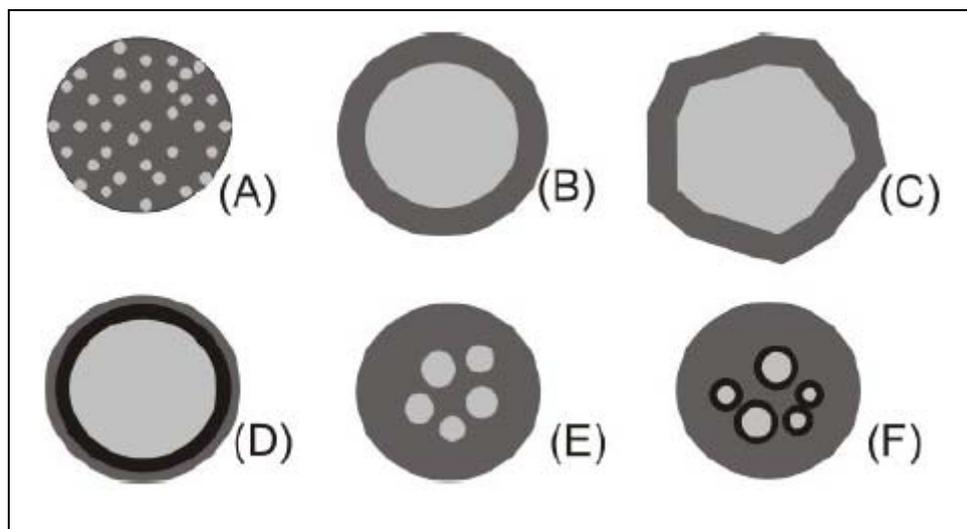


FIGURA 7: Modelos de microcápsulas (A): matriz (microesfera; (B): microcápsula simples; (C): simples, irregular; (D): duas paredes; (E): vários núcleos; (F): agrupamento de microcápsulas
Fonte: AZEREDO, 2005

Para uma aplicação específica, o método de encapsulação escolhido deve levar em consideração as características do produto a ser encapsulado e do polímero. Do produto, deve-se conhecer a polaridade, solubilidade e estabilidade frente às condições externas. Para o polímero, devem ser previamente conhecidas a polaridade, solubilidade, taxa de degradação, estabilidade e ponto de fusão (CAMPOS, 2008). Dentre os métodos de encapsulação destacam-se:

2.6.2.1 Atomização (*spray-drying*)

Método utilizado desde a década de 1930 na indústria de alimentos. O ingrediente ativo é emulsificado e bombeado através de um atomizador para uma câmara de alta temperatura. No meio gasoso, tomam forma esférica, com a fase ativa “empacotada” no interior da fase aquosa, formando cápsulas geralmente do tipo matricial (SAEZ; HERNÁNDEZ; PENICHE, 2007; AZEREDO, 2005).

2.6.2.2 Extrusão

Esta técnica envolve dispersão do material do núcleo em uma massa fundida de um carboidrato, sendo a mistura forçada através de moldes para um líquido desidratante. No estado sólido, os filamentos são quebrados em fragmentos

menores, separados e secos. Este método é empregado quando se desejam fragmentos visíveis e geram produtos de alta estabilidade pela ausência de material na superfície, com encapsulação completa (AZEREDO, 2005).

2.6.2.3 Leito fluidizado

Partículas da substância a ser revestida são encaminhadas em fluxo ascendente através de um leito e a solução com o material de revestimento é atomizada nas partículas, cujo fluxo é direcionado para uma câmara e o material revestido se solidifica quando lançado em uma coluna descendente de ar, podendo ser novamente lançado no leito, com sucessivas passagens de revestimento (SAEZ; HERNÁNDEZ; PENICHE, 2007).

2.6.2.4 Coacervação

A coacervação simples consiste na dessolvatação do material de revestimento e sua deposição na superfície das partículas ou gotículas a serem revestidas. As fases são separadas por adição de solvente, alteração de pH ou temperatura ou ainda pela adição de um sal ou polímero incompatível. Já na coacervação complexa, a separação de fases ocorre por atração eletrostática entre dois ou mais polímeros de cargas opostas, após serem misturados em meio aquoso (SAEZ; HERNÁNDEZ; PENICHE, 2007).

2.6.2.5 Liofilização

Método de desidratação por sublimação de um produto congelado, que ocorre nas etapas de congelamento rápido do produto e sublimação do material sob vácuo. Para a encapsulação, o material congelado é uma emulsão do ingrediente ativo na substância encapsulante (AZEREDO, 2005).

2.6.2.6 Secagem em tambor

Secagem por contato, na qual o material é espalhado em uma camada bem fina na superfície de um tambor rotativo aquecido (AZEREDO, 2005).

2.6.2.7 Inclusão molecular

Processo que ocorre a nível molecular, tendo ciclodextrinas (CD) como encapsulantes (AZEREDO, 2005). Ciclodextrinas são uma família de oligossacarídeos cíclicos compostos por subunidades glicopiranosicas ligadas em posição α -(1-4), sendo também conhecidas como cicloamiloses, ciclomaltoses e dextrinas de Schardinger (DEL VALLE, 2003). A molécula resultante atua como cápsula de superfície externa polar e cavidade apolar, tornando-a capaz de atuar como receptora e formar complexos de inclusão com uma grande variedade de moléculas de baixa polaridade (AZEREDO, 2005).

Os polímeros são os materiais mais freqüentemente empregados para microencapsulação e podem ser de origem natural, sintética e semi-sintética, destacando-se, os citados a seguir:

- a) natural: compostos de polissacarídeos animal ou vegetal, tais como alginato, dextrana, goma arábica ou quitosana;
- b) semi-sintéticos: podem ser citados os derivados de celulose, tais como etil-celulose e celulose acetobutirato.
- c) Sintéticos: Derivados de acrílico e poliéster são os mais amplamente utilizados. Poliésteres são polímeros biodegradáveis que podem ser administrados por via parenteral. Dentre eles, destacam-se poli- ϵ -caprolactona, ácido polilático e os copolímeros de ácido lático e ácido glicólico (PLGA) (SAEZ; HERNÁNDEZ; PENICHE, 2007).

Foram estudados sistemas baseados em poli(ácido lático) (PLA) e poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) para encapsular proteínas terapêuticas e, entre elas, o IFN- α . Entretanto, estes sistemas resultaram em decréscimo de atividade da proteína (THITINAN e McCONVILLE, 2009). Outra opção apresentada foi o uso de microcoros de alginato de cálcio circundados por revestimento de poli-DL-lactídeo-poli(etilenoglicol) (PELA), no qual foi observada maior conservação da atividade do

interferon do que utilizando somente a matriz polimérica PELA ou PLGA (THITINAN e McCONVILLE, 2009; ZHOU, *et al.*, 2002).

Como propostas comerciais, em fase de testes clínicos, têm-se:

- Locteron™, formulação de IFN- α -2b contendo copolímeros de polietilenoglicol e poli(tereftalato de butileno). A proposta deste medicamento, desenvolvido pela Biolex Therapeutics, é a de aplicação do mesmo a cada 2 semanas. Encontra-se em fase II de testes clínicos;
- Medusa®, formulação usando polímero baseado em cadeias hidrofílicas de poli-L-glutamato e moléculas hidrofóbicas de α -tocoferol. Encontra-se em fase II de testes clínicos. (THITINAN e McCONVILLE, 2009).

Embora existam grandes avanços nestas técnicas para o IFN- α , uma das limitações destes métodos está no fato de que as proteínas são materiais frágeis para as condições de encapsulação. Além disso, é um método de difícil escalonamento, dificultado sua implementação para a obtenção industrial de produtos terapêuticos.

2.6.3 Lipossomas

Seguindo a mesma proposta das microcápsulas, foram estudadas também composições farmacêuticas de IFN- α empregando lipossomas, que são vesículas esféricas constituídas de uma ou várias bicamadas concêntricas de lipídeos, isolando um ou vários compartimentos aquosos do meio externo, sendo classicamente preparados a partir de glicerofosfolípideo, fosfatidilcolina, capazes de incorporar substâncias hidrofílicas ou lipofílicas, podendo ser alteradas de acordo com requisitos farmacêuticos e farmacológicos, permitindo liberação controlada do fármaco encapsulado, com redução significativa de sua toxicidade e interações medicamentosas, com um mínimo de reações inflamatórias locais (MACHADO;

GNOATTO; KLÜPPEL, 2007). Nesta técnica, YANG e colaboradores (2006) desenvolveram um método de preparo de partículas contendo o IFN- α -2b. Uma vez que o tamanho do lipossoma interfere no perfil de liberação do fármaco, neste trabalho foi observado que lipossomas de maior tamanho (> 100 nm) podem ser eficientes para uso tópico, como para o tratamento de herpes genital, por exemplo; enquanto que os menores (≤ 100 nm) podem ser eficientes para aplicação parenteral, no caso do tratamento do vírus da hepatite (YANG, *et al.*, 2006).

2.6.4 Implantes

As microesferas apresentam limitações com uso dos polímeros sintéticos PLA e PLGA, devido aos fatores inerentes à produção, tais como forças de cisalhamento, formação de interface, acidificação e interações proteína polímero, que podem resultar na desnaturação da proteína (MOHL e WINTER, 2004; HERRMANN, *et al.*, 2007). Desta forma, outra proposta de liberação controlada do medicamento foi o uso de implantes intradérmicos.

Como exemplo para uso do IFN- α , tem-se o implante desenvolvido com matriz lipídica de triestearina, na qual a proteína IFN- α 2a foi adicionada liofilizada (estabilizada com trealose ou hidroxipropil- β -ciclodextrina). A matriz foi confeccionada com diferentes proporções de triestearina e polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) (MOHL e WINTER, 2004; THITINAN e McCONVILLE, 2009). PEG foi adicionado à matriz como modificador de liberação, uma vez que foi verificado que a matriz lipídica sozinha apresentou um perfil de liberação insatisfatório, com 80% de todo material do implante liberado em período de 7 dias. Como resultados experimentais, 90 a 95% do IFN- α incorporado foi liberado continuamente deste sistema durante 1 mês. Tais resultados apresentam este sistema como promissor para liberação controlada de proteínas, necessitando de mais estudos para obtenção de implantes com perfil de liberação melhor definido (MOHL e WINTER, 2004).

A Tabela 5, a seguir apresenta uma comparação entre os sistemas estudados para a liberação do IFN:

Tabela 5: benefícios e limitações dos sistemas de liberação controlada para IFN

Sistema	Benefícios	Limitações
Pegulação química (modificação química)	<p>Reduz eliminação renal e tempo entre aplicações</p> <p>Confere proteção à proteína</p>	<p>Compromete a atividade da proteína</p> <p>Baixo rendimento do processo</p> <p>Gera produto heterogêneo, com isômeros de posição</p>
Modificação genética	<p>Tempo entre aplicações pode chegar a duas semanas</p>	<p>Produção tecnicamente difícil e a razão benefícios/riscos ainda é considerada desfavorável.</p>
Microesferas	<p>Capaz de reduzir os efeitos colaterais.</p>	<p>Dificuldades na produção em escala industrial e baixo rendimento.</p> <p>Desnaturação da proteína durante a produção.</p> <p>Instabilidade da proteína encapsulada.</p> <p>Incompleta liberação da proteína.</p>
Lipossomas	<p>Menores reações locais.</p> <p>Reduz toxicidade e efeitos colaterais.</p>	<p>Tamanho interfere na capacidade de permeabilidade.</p> <p>Dificuldades de obtenção de produto com elevada estabilidade físico-química.</p>
Implantes	<p>Permite liberação por períodos mais longos.</p>	<p>Necessidade de maiores estudos da porosidade para aperfeiçoar o perfil de liberação.</p>

Fonte: elaboração a partir dos dados no texto e adaptado de THITINAN e McCONVILLE, 2009.

2.7 CARACTERIZAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS TERAPÊUTICOS

O objetivo de um desenvolvimento farmacêutico é desenhar um produto de qualidade, bem como seu processo de obtenção, para que de modo consistente possa ser alcançado o desempenho pretendido para o produto. Durante o desenvolvimento, obtêm-se experiência e informações gerando as combinações de variáveis que irão sustentar o desenho de processo de obtenção proposto para o produto. Além disso, as informações obtidas nos estudos realizados durante o desenvolvimento são a base para o estudo do gerenciamento dos riscos apresentados e para estabelecer as especificações do produto final e também dos controles em processo (ICH-Q8, 2008).

Devido às propriedades inerentes aos materiais poliméricos, mesmo as mais poderosas técnicas de síntese não têm valor sem a capacidade de caracterização completa do produto obtido. É necessária a determinação precisa dos parâmetros estruturais, para que se possa correlacionar tais parâmetros às propriedades e funções para as quais foram desenvolvidos (FLORENZANO, 2008). Essa caracterização completa assume grande importância quando o polímero é um material biofarmacêutico, que requer rigoroso controle de qualidade para assegurar sua segurança e eficácia (SILVA *et al*, 2008).

Diferente das moléculas orgânicas pequenas, as propriedades dos polímeros não dependem apenas dos monômeros que formam suas cadeias, mas também de sua massa molar, grau de ramificação, e outras características. Portanto, a caracterização de polímeros está baseada, quase que exclusivamente nas características citadas acima e existem várias técnicas de caracterização. Entre elas, merecem destaque as que são baseadas em espalhamento de luz visível, por serem não invasivas, de baixo custo e permitirem a determinação de parâmetros estruturais de maneira absoluta, sem a necessidade do uso de um padrão (FLORENZANO, 2008).

2.7.1 Técnicas de caracterização de polímeros

2.7.1.1 Espalhamento de luz laser de baixo ângulo (LALLS – *Low Angle Laser Light Scattering*)

Nesta técnica utilizada para polímeros em solução, os detectores medem a intensidade da luz espalhada a partir da amostra diluída. A fonte de luz é um laser, como por exemplo, He/Ne, e o espalhamento é medido por um ou mais detectores em ângulos fixos, que são inversamente proporcionais ao tamanho da partícula. A luz espalhada é coletada por um detector e analisada com base em um padrão de difração previamente definido. Grupos de partículas apresentam padrões idênticos à soma dos padrões individuais de espalhamento de luz de todas as partículas presentes, podendo-se obter uma curva de distribuição de tamanhos de partícula da amostra, a partir da contribuição de frequência de cada fração (HELD e KILZ, 2009; ROVERE *et al.*, 2008).

Além do espalhamento de luz laser de baixo ângulo (LALLS), existem ainda RALLS (*Right Angle Light Scattering* – espalhamento de luz laser de ângulo definido) e MALLS (*Multi Angle Light Scattering* – espalhamento de luz laser em multi-ângulos). A diferença entre eles são os detectores, em número e posição de ângulos detectados. Instrumentos para LALLS empregam apenas um ângulo reduzido (6 ou 7 °), e RALLS emprega somente o ângulo de 90 °. Já para MALLS os detectores medem diversos ângulos simultaneamente (HELD e KILZ, 2009).

2.7.1.2 Difração de raios X (DRX)

É uma das técnicas indicadas para determinação de fases cristalinas em materiais, que se realiza na maior parte dos sólidos (amostras em forma de cristais), onde os átomos se ordenam em planos cristalinos separados entre si por distâncias da mesma ordem de grandeza dos comprimentos de onda dos raios X (ALBERS, A. *et al.*, 2002). Cerca de 95% de todos os materiais sólidos podem ser descritos como cristalinos e geram um padrão de difração ao interagirem com raios X, sendo este padrão de difração a “impressão digital” da substância, o que torna o método de

difração de raios X muito adequado para a identificação de fases policristalinas (SCINTAG, 1999).

Nesta técnica, quando se incide um feixe de raios X sobre um cristal, há interação com os átomos presentes, gerando a difração, que ocorre segundo a Lei de Bragg, na relação, a seguir (ALBERS *et al.*, 2002):

$$n\lambda = 2d \sin \Theta$$

n: número inteiro

λ : comprimento de onda do feixe de raios X incidentes

d: distância entre as camadas atômicas do cristal

Θ : ângulo de difração

2.7.1.3 Espectroscopia UV

As medidas de absorbância são normalmente usadas para determinar a concentração de macromoléculas biológicas em solução, sendo linearmente relacionada à concentração pela Lei de Lambert-Beer, a seguir.

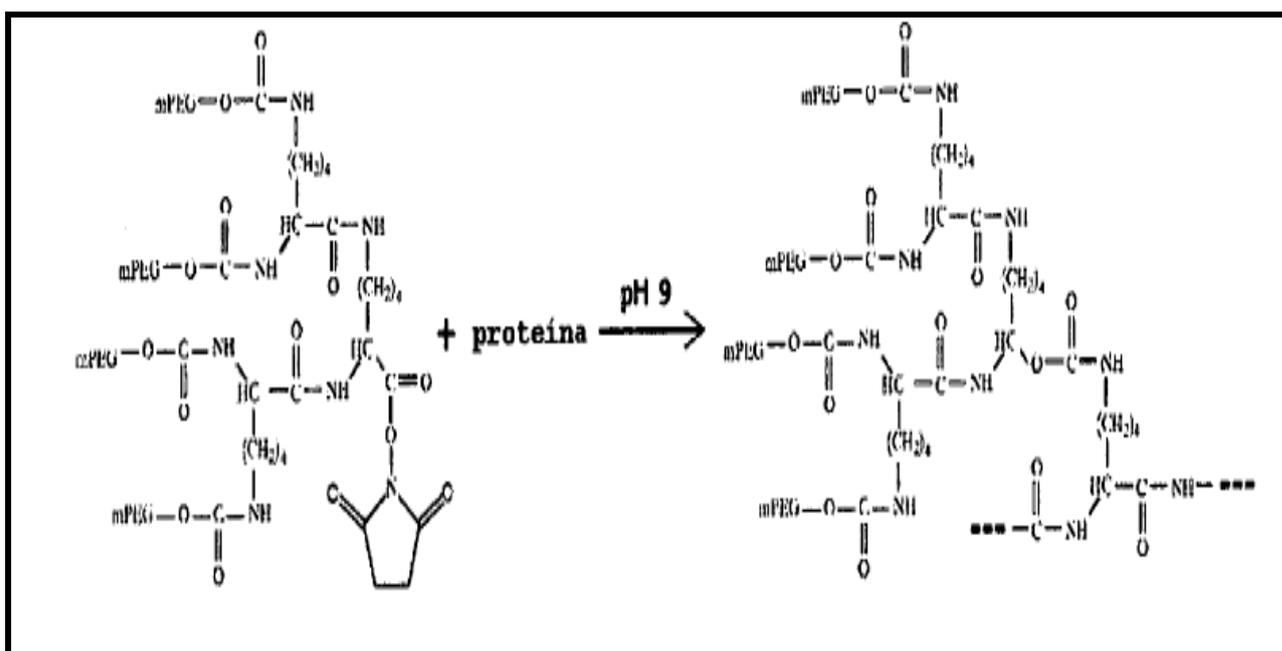
$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

onde **A** representa a absorbância, **c** é a concentração molar, **l** o caminho ótico, dado em centímetros e ϵ o coeficiente de absorvidade molar, que pode ser determinado experimentalmente ou calculado pela soma das contribuições dos aminoácidos aromáticos que constituem a proteína. Além da contribuição das ligações peptídicas, que absorvem fortemente abaixo de 230 nm, a absorção de proteínas na faixa entre 230 a 300 nm é determinada pelas cadeias laterais aromáticas de tirosina, triptofano e fenilalanina. As pontes de dissulfeto apresentam fraca absorbância, em torno dos 250 nm (CREIGHTON, 1995).

3 DESENVOLVIMENTO

A proposta para o novo interferon peguilado a ser produzido no Brasil e em Cuba está baseada na patente PI 0604313-5, de prioridade cubana de 2005 e depositada no Brasil em 19 de outubro de 2006. A patente descreve uma estrutura polimérica de quatro ramificações de monometoxi-polietilenoglicol. A proposta é a de uma estrutura com quatro ramos semelhante a um dendrímero, que permite melhor proteção da superfície da proteína que pode ser funcionalizado e conjugado à proteínas de interesse farmacêutico (CIGB, 2006). Definem-se por dendrímero as macromoléculas baseadas em estruturas poliméricas formadas a partir de unidades oligoméricas ou poliméricas, formando camadas de ramificação, apresentando geralmente estrutura simétrica, com potencial para criar um sítio ativo isolado por funcionalização química (FARAJI e WIPF, 2009).

A reação de conjugação ocorre entre os grupos amino da proteína e o PEG funcionalizado como éster de hidroxissuccinimida. Até certo grau, pode-se planejar os sítios de conjugação, com uso de pH em torno de 9, que favorece a conjugação através do grupo ϵ -amino das lisinas (Equação 5) (CIGB, 2006).



Equação 5 - Fonte: CIGB, 2006

3.1 O processo de conjugação proposto

O processo de conjugação inicialmente proposto na patente citada está descrito nas seguintes etapas, a partir do ingrediente farmacêutico ativo (IFA) de alfainterferona 2b humana recombinante convencional:

- Concentração da IFA por filtração tangencial;
- Reação do PEG ativado com 1 g de IFA a 6 mg/mL diluída em tampão borato, pH 8,5, a 4 °C e por 2 horas sob agitação suave;
- Parada da reação por diluição do meio reacional a 50 vezes seu volume, com solução tampão de acetato, pH 4;

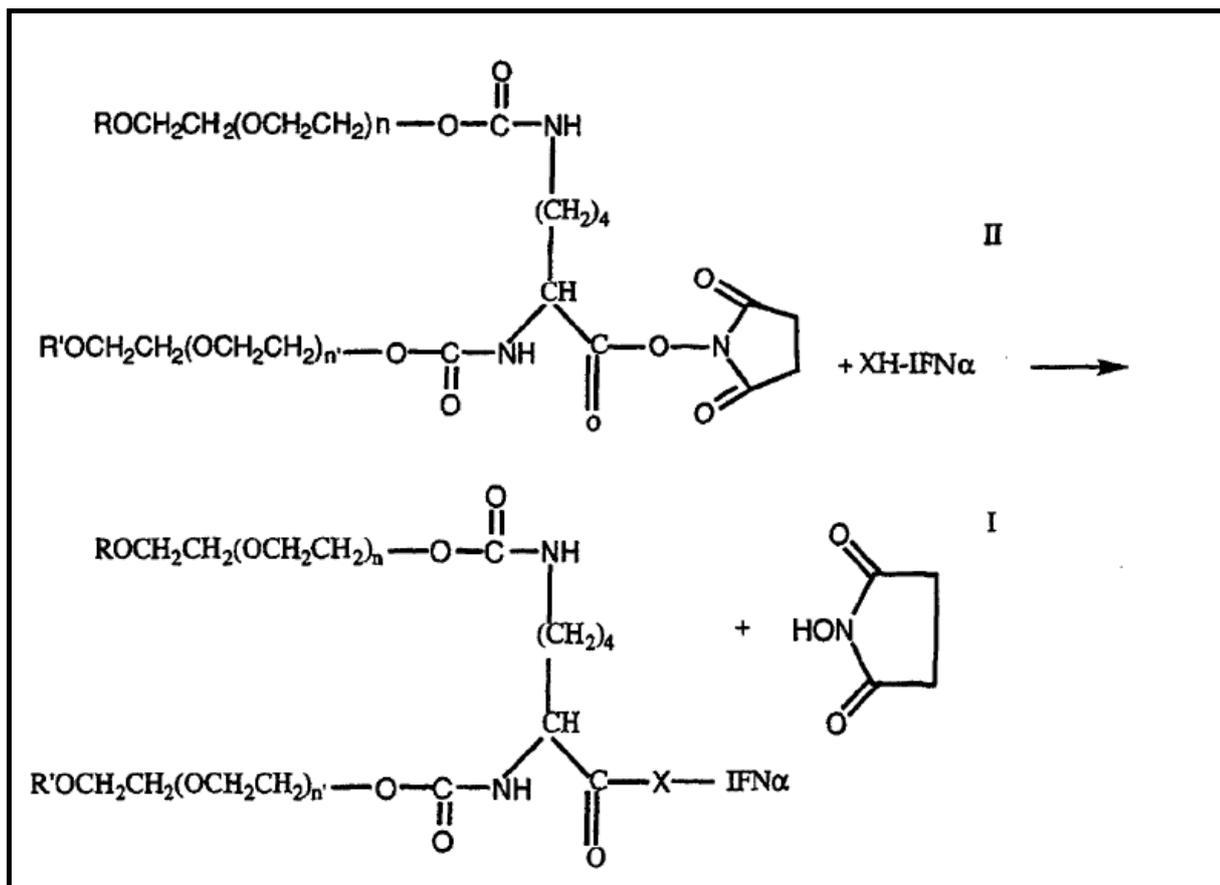
A partir destas etapas, o conjugado deve ser purificado, por cromatografia em trocador catiônico fraco até a obtenção da IFA peguilada (CIGB, 2006).

3.2 Outros processos de conjugação registrados

No Brasil existem dois medicamentos a base de interferon peguilado registrados: Pegasys, IFN-alfa 2a, produzido pela Hoffman-La Roche e PegIntron, IFN-alfa 2b, produzido pela Schering-Plough.

3.2.1 Produção do Pegasys®

Neste processo, o conjugado é produzido por ligação covalente do IFN- α 2a ao PEG que é ativado por substituição da hidroxila do PEG por um grupo ligante formando o reagente éster de N-hidroxisuccinimida. A ligação deste éster à proteína ocorre via ligação amida, onde na Equação 6 abaixo, X representa NH_2 , o sítio de ligação entre PEG ativado e IFN. O reagente ativado liga-se preferencialmente a aminas primárias, como por exemplo, os grupamentos NH_2 de lisina existentes no interferon. O ativado pode também ligar-se a grupamentos OH, como presentes, por exemplo, na serina, com XH representando OH (F. HOFFMAN-LA ROCHE, 2003).



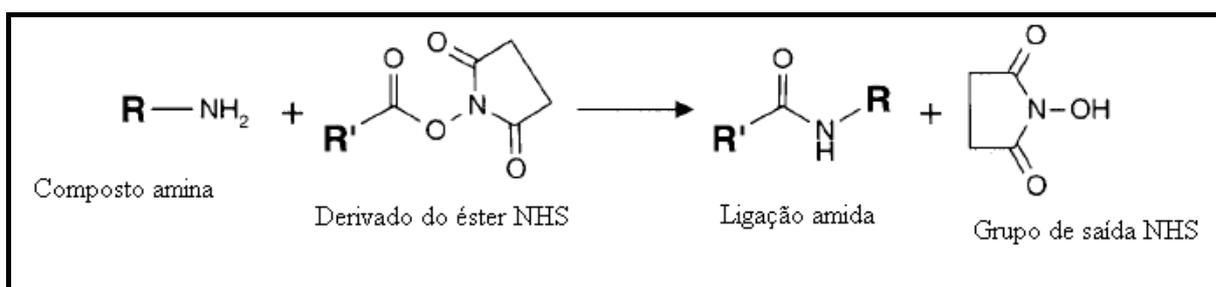
Equação 6 – Fonte: F. HOFFMAN-LA ROCHE (2003).

Para este processo, as condições propostas são as seguintes:

- Proporção IFN / PEG em massa: 1/6
- PEG é adicionado à reação dissolvido em HCl 1 mM a 4 °C
- Reação a 4° C por 2 horas
- pH do meio reacional igual a 9
- Parada da reação com ajuste de pH para 4,5 com ácido acético glacial
- Diluição do meio reacional com água a 10 vezes o volume inicial e purificação cromatográfica (F. HOFFMAN-LA ROCHE, 2003).

Nesta reação de conjugação, o uso do reativo N-hidroxissuccinimida (NHS) já havia sido descrito em MONFARDINI *et al.*, 1995. A técnica de conjugação adotada é a modificação de aminas com grupamentos NHS-aldeído, sendo a ativação empregando éster de NHS a mais comum modificação química disponível

comercialmente. A reação com aminas secundárias e primárias cria ligações amida e imidas estáveis. Portanto, em moléculas protéicas, os reagentes contendo o éster de NHS efetuam ligações de conjugação principalmente com α -aminas no N-terminal e ϵ -aminas nas cadeias laterais das lisinas. Como descrito na Equação 7, reação geral entre amina e derivado NHS, ocorre a reação com o nucleófilos da proteína que liberam o NHS como grupo de saída para formar um produto acilado (HERMANSON, 2008).



Equação 7 - Fonte: adaptado de HERMANSON, 2008.

Nas propostas de conjugação apresentadas, o PEG ativado com o grupamento NHS é previamente dissolvido em HCl 1M. Entretanto, em HERMANSON (2008), o reagente é descrito como insolúvel em água, devendo ser previamente dissolvido em dimetilformamida (DMF) ou acetonitrila. Sendo assim, embora publicações anteriores das patentes acima citadas e RAMON *et al.*, 2007 mencionem a dissolução do polímero ativado em HCl, torna-se válida a avaliação dos solventes acima citados para a execução do processo, a fim de verificar aumento de rendimento da reação.

3.2.2 Produção do PegIntron®

PegIntron é o nome comercial do interferon peguilado produzido pela Schering-Plough. É um conjugado covalente de IFN- α 2b ligado a uma única cadeia linear da molécula de PEG com 12 kDa. O reativo ativado também possui como grupo terminal o succinimidil carbamato (SC-PEG), como anteriormente apresentado na Equação 1. Este processo foi desenhado para que, em princípio, a peguilação ocorra em qualquer um dos sítios nucleofílicos dos 165 aminoácidos da proteína.

Estes sítios incluem os grupos ϵ -amino das lisinas, o α -amino grupo no N-terminal da cisteína, os nitrogênios dos grupamentos imidazóila das histidinas e os grupos hidroxila das serinas, treoninas e tirosinas. A natureza inespecífica da reação levou a obtenção de uma mistura de espécies monopeguiladas, e foi observado que o produto da peguilação varia consideravelmente em função do pH da reação: com pH acima de 6,5, reduz-se o grau de peguilação com histidinas e cisteínas e as lisinas se tornam o sítio dominante de peguilação. Assim, o aumento de pH eleva a quantidade relativa das formas nucleofílicas desprotonadas das lisinas, que se tornam o sítio predominante, enquanto que pH reduzido de 6,5 a 4,5, resulta em produto peguilado na His³⁴ em pequenas quantidades e grandes quantidades de peguilado na His⁷ (Figura 6), o que se deve às diferenças estruturais do IFN- α -2b nestes diferentes valores de pH (YOUNGSTER *et al.*, 2002).

3.3 Propriedades da proteína

A reação ocorre via ligação amida com aminas primárias. As aminas primárias presentes na estrutura do IFN- α são: lisinas, histidinas, cisteína, serina e tirosina. Como a lisina está presente em maior quantidade e em sítios mais disponíveis é o aminoácido alvo na reação com o ativado de 48 kDa, proposto na patente cubana (Figura 7).

O pH 9 para a reação foi definido pelo fato de que a reação ocorre entre éster de N-hidroxisuccinimida e NH_2 . Para que existam grupamentos NH_2 disponíveis na lisina, o pH do meio reacional deve estar em valor tal que o possibilite. Neste caso, valores de 8,5-9,5 possibilitam a presença de espécies NH_2 , que realizam as ligações amida com a saída do grupo NHS (Equação 7).

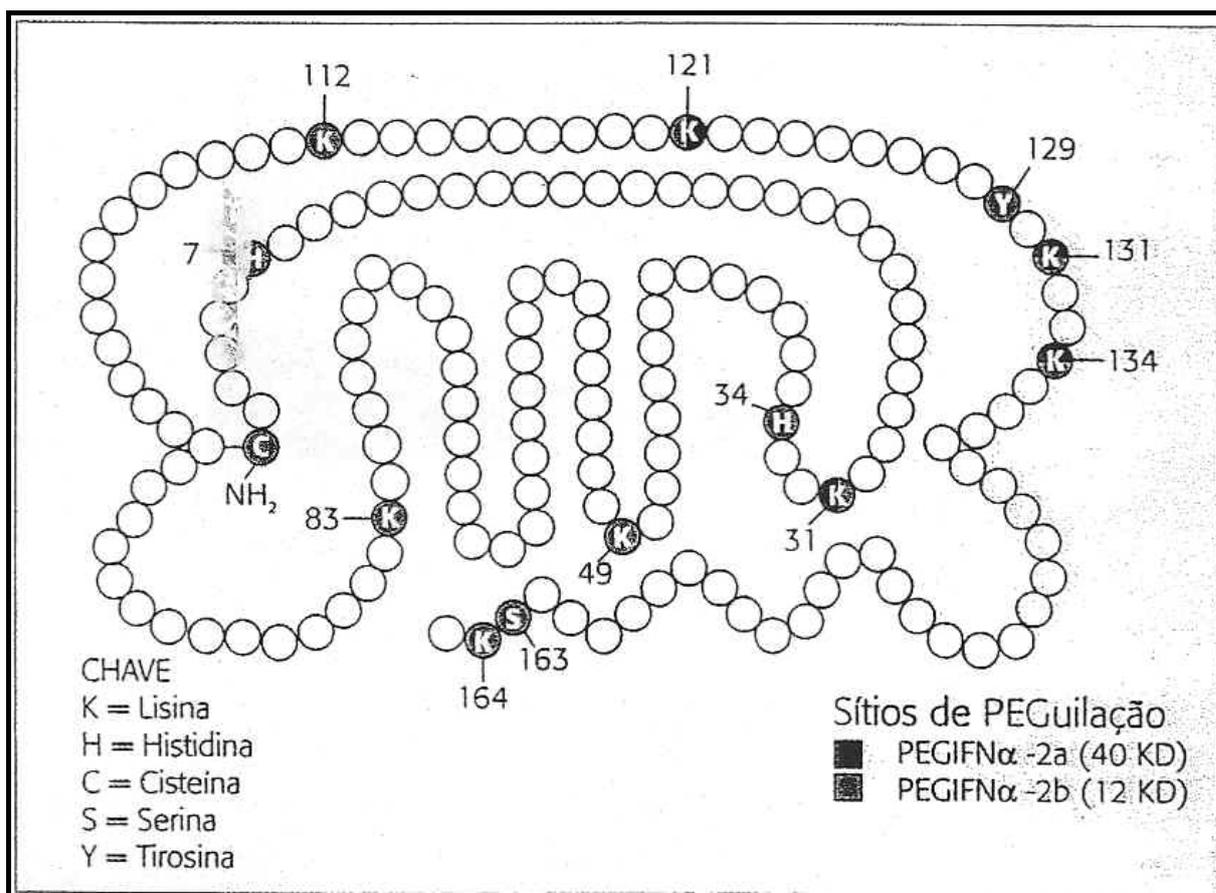


Figura 8: Sítios de Ligação do IFN- α no processo de peguilação.
 Fonte: BEZERRA e OLIVEIRA, 2007, adaptado de LUXON *et al*, 2002.

3.4 Comparação entre os produtos

Os processos descritos acima para a obtenção dos produtos conjugados são bem similares, quanto à implementação e escalonamento. A diferença entre eles está na cadeia polimérica empregada, que irá limitar a eliminação renal do medicamento.

Pesquisas demonstraram que a eliminação renal de PEG é inversamente relacionada com sua massa molecular. Experimentos com modelos animais demonstraram que é observado um aumento no tempo de residência na corrente sanguínea com o aumento da massa de PEG. (FILPULA, 2008). Entretanto o tamanho de partícula não figura entre as características destes conjugados e será uma das caracterizações apresentadas neste trabalho.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As análises a seguir foram realizadas no laboratório de biomateriais (LABIOMAT) do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF). O objetivo foi o de:

- verificar o maior tamanho de partícula da molécula de IFN-alfa 2b peguilada produzida em Bio-Manguinhos frente ao tamanho da molécula IFN- α 2b peguilada produzida pela Schering
- verificar similaridade das curvas do espectro de absorção UV, uma vez que se trata da mesma proteína (IFN-alfa 2b)

As amostras de interferon peguilado selecionada como referência foi somente a de PegIntron®, pois no Pegasys®, produzido pela Hoffman La-Roche a proteína peguilada é IFN-alfa 2a.

As amostras utilizadas se encontravam nas seguintes condições:

- Amostra de PEG ativado de 48 kDa: amostra sólida, produzida no CIGB e fracionada para as análises deste trabalho. Conservada a -20°C .
- Amostra de Bio-Manguinhos: amostra purificada, líquida e na condição de produto final, conservada em temperatura de 4 a 8°C .
- Amostra PegIntron: amostra em sua embalagem comercial, liofilizada, com líófilo contendo 80 microgramas de proteína peguilada, conservada em temperatura de 4 a 8°C .

4.1 Análise do tamanho de partícula

4.1.1 Equipamento e reagentes

- Analisador de partículas SALD-2201, Shimadzu
- Amostra de interferon peguilado lote 09PIBIP003EX, produzida em Bio-Manguinhos com base na patente PI 0604313-5

- Amostra de interferon peguilado PegIntron, Schering, lote 71QG40102
- Amostra de PEG ativado de 48 kDa, obtido de acordo com a patente PI 0604313-5
- Álcool isopropílico VETEC

4.1.2 Procedimento

Para a leitura direta do tamanho de partícula no equipamento, foram realizados os seguintes procedimentos:

- 1 mL interferon peguilado produzido em Bio-Manguinhos foi transferido diretamente para a cubeta de leitura, para a realização da medida, o volume da cubeta foi completado com álcool isopropílico a fim de tornar o material insolúvel contendo partículas que pudessem ser detectadas pelo feixe de laser.
- o PEG ativado de 48 kDa foi ressuspensão em álcool isopropílico e transferido para a cubeta de leitura e a medida foi realizada.
- O PegIntron liofilizado foi ressuspensão em álcool isopropílico, transferido para a cubeta de leitura e a medida foi realizada.

O equipamento é dotado de sistema homogeneizador no local onde a cubeta é posicionada, a fim de garantir que a amostra ressuspensa esteja completamente homogênea no momento em que o feixe de laser a atravessa.

4.2 Análise do espectro UV

4.2.1 Equipamento, materiais e reagentes

- Espectrofotômetro UV visível UV-2450, Shimadzu
- Cubeta de quartzo de 0,5 mL
- Amostra de interferon peguilado lote 09PIBIP003EX, produzida em Bio-Manguinhos com base na patente PI 0604313-5
- Amostra de PegIntron, Schering, lote 71QG40102

- Água deionizada

4.2.2 Procedimento

A amostra de IFN-PEG de Bio-Manguinhos (líquida) foi transferida diretamente para a cubeta e a leitura foi realizada.

A amostra de PegIntron (liofilizada) e contendo 80 µg da proteína peguilada foi diluída com 1,5 mL de água deionizada e transferida para a cubeta para a realização da leitura.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Tamanho de partícula

Através da difração a laser o equipamento detecta as partículas presentes na amostra e o software constrói uma curva de distribuição de tamanho, fornecendo também o tamanho médio, na forma dos gráficos apresentados a seguir:

Gráfico 3 – Distribuição para a amostra de Bio-Manguinhos

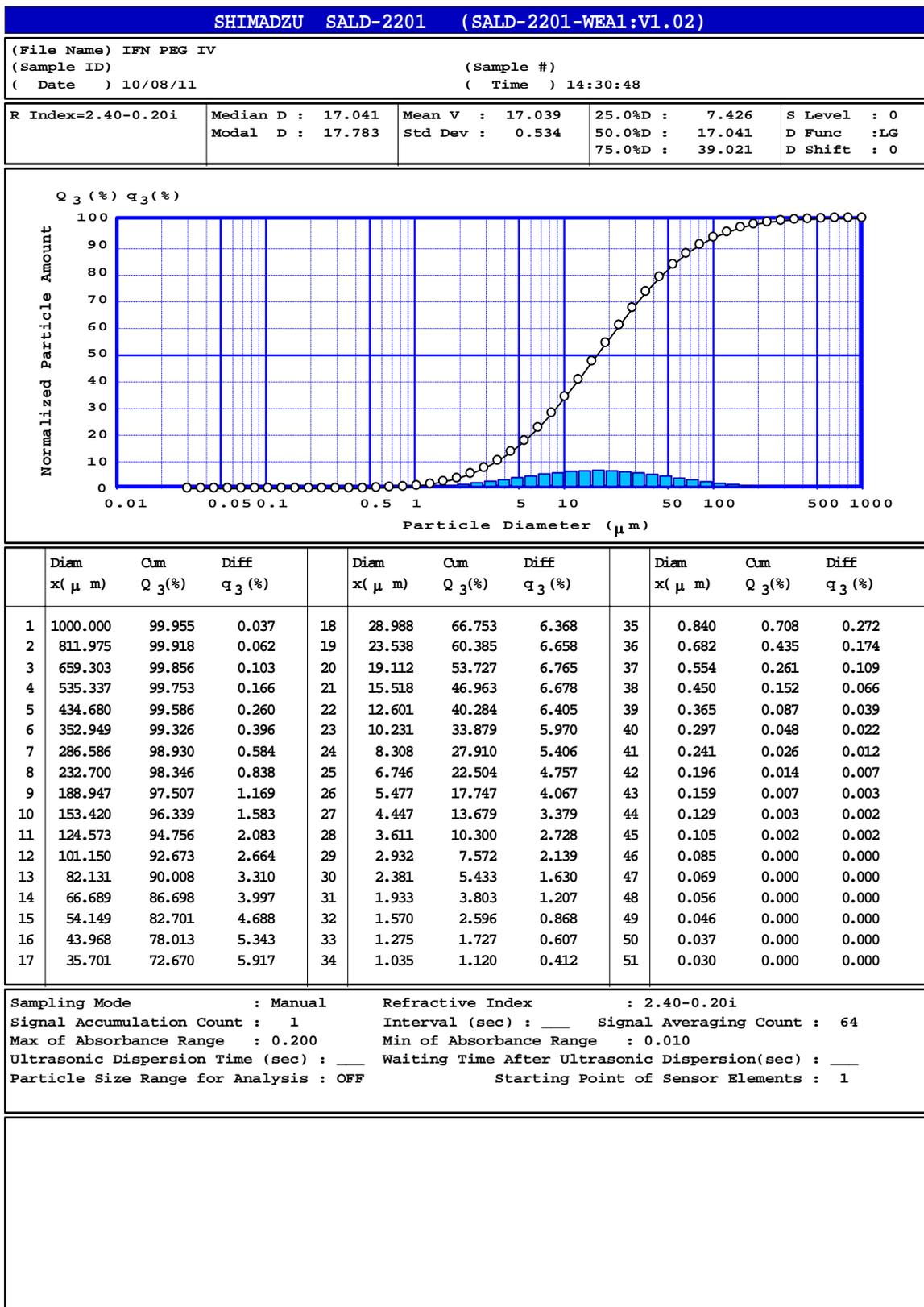


Gráfico 4 – Distribuição para a amostra de PegIntron

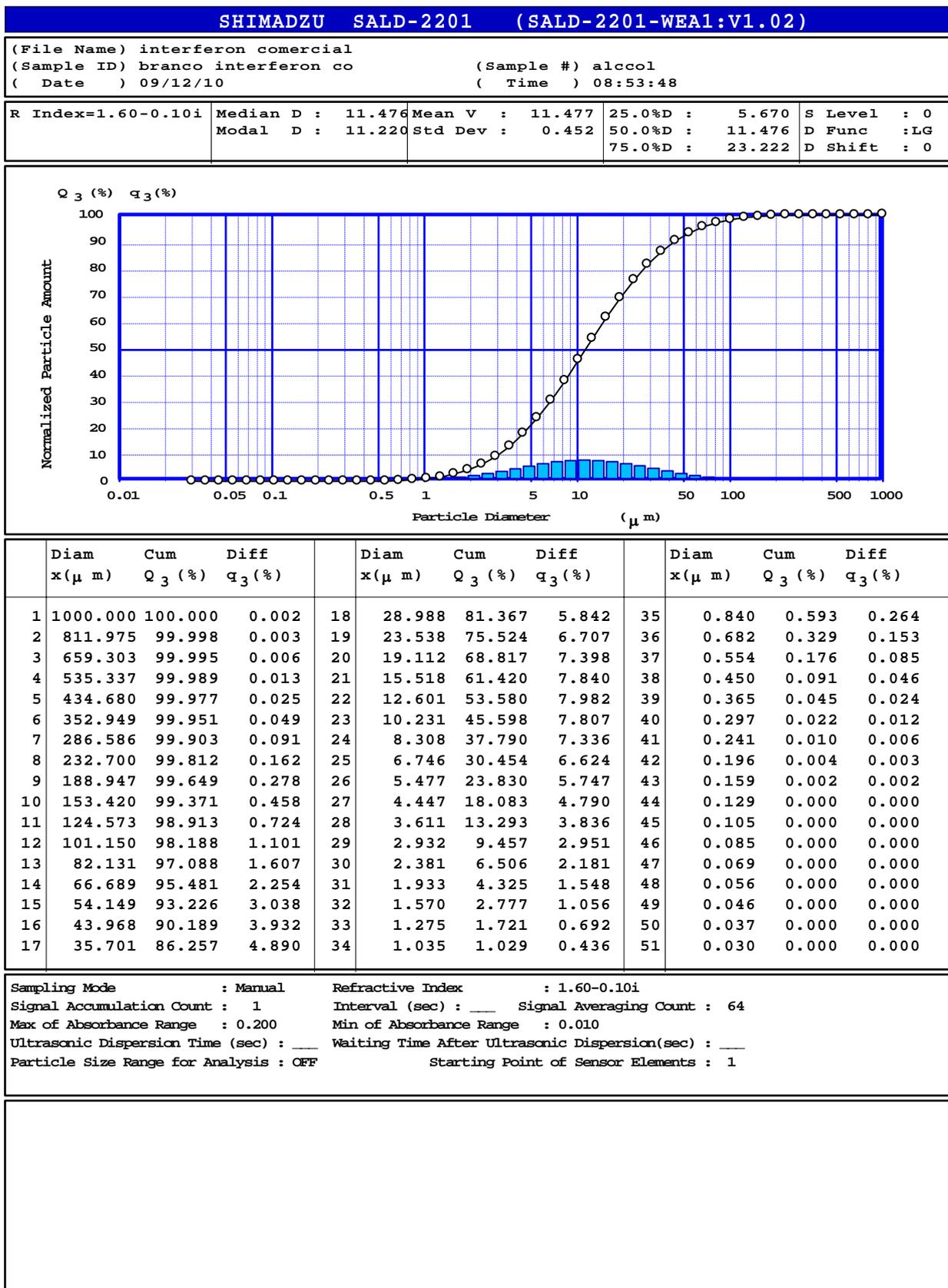
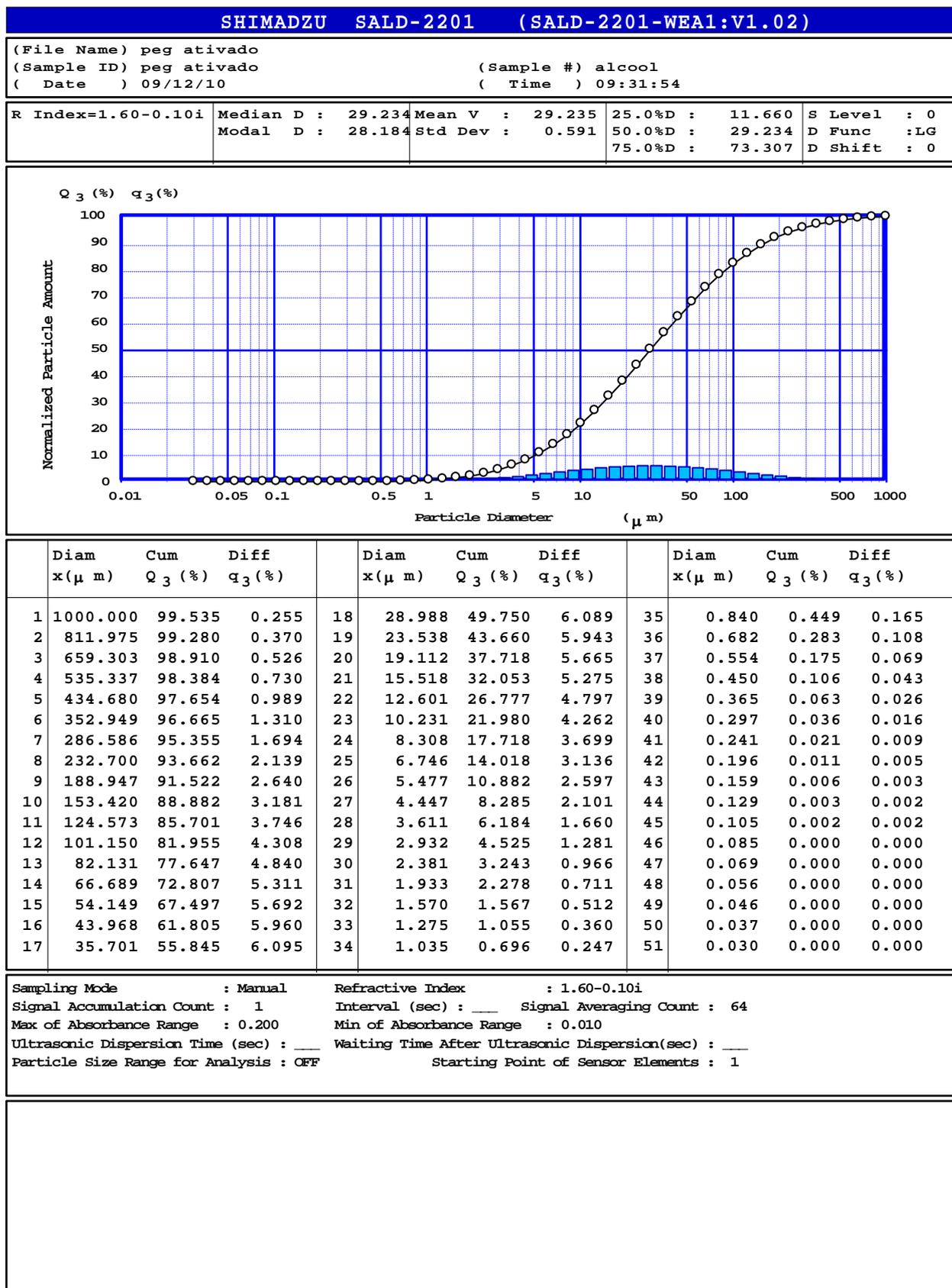


Gráfico 5 – Distribuição para a amostra de PEG ativado 48kDa



A Tabela 6, a seguir, apresenta os resultados de tamanho médio de partícula para as três amostras:

Tabela 6: Resultados de tamanho de partículas

<i>Amostras</i>	<i>Tamanho médio (μm)</i>
IFN Peguilado – Bio-Manguinhos	17,783
IFN Peguilado – Schering	11,220
PEG ativado 48 kDa	28,184

5.2 Espectro de absorção no ultra-violeta

Os gráficos com os perfis de absorção no UV das duas proteínas foram sobrepostos e as curvas são apresentadas no Gráfico 6, a seguir:

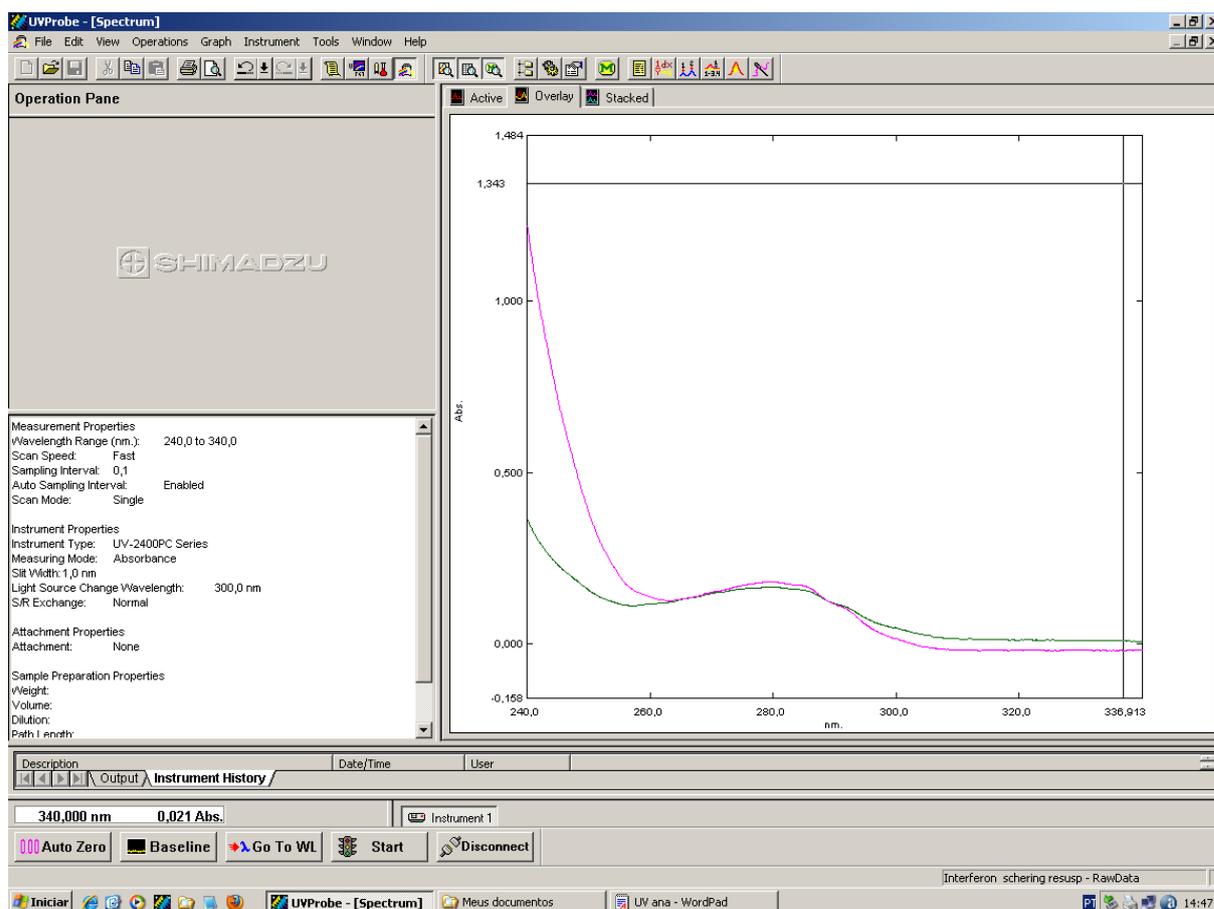


Gráfico 6: espectros de absorção no UV para as amostras de interferon peguilado
Em verde: Curva PegIntron; em rosa: curva IFN-PEG (Bio-Manguinhos)

Os resultados das análises sugerem que o polietilenoglicol ativado e sob a forma semelhante a um dendrímero gera um produto conjugado de maior tamanho que o conjugado utilizado como comparação, que é produzido com polímero ativado de 12 kDa e cadeia linear. Deve-se observar que o tamanho de partícula é uma determinação importante para este tipo de medicamento uma vez que o tamanho (não somente o peso) pode definir a possibilidade de evitar a eliminação por filtração renal.

É importante notar também que a dispersão para as duas amostras de interferon peguillado apresentaram distribuição bastante ampla e esta técnica de caracterização detecta diversos tamanhos de partículas nas amostras, o que as revela como produtos heterogêneos, com isômeros de posição e aglomerados de massa maior que as moléculas.

Além disso, foi observado que o perfil do espectro no UV das proteínas peguilladas é bem similar, sugerindo que o IFN- α 2b da amostra de Bio-Manguinhos foi preservado após a reação de conjugação.

Quanto ao tamanho da partícula, embora o interferon seja o medicamento recomendado para o tratamento da hepatite C, juntamente com a ribavirina, o interferon não modificado, tal como muitas outras proteínas de baixa massa molecular, apresenta curta meia-vida na circulação do paciente, com pouca ou nenhuma citocina detectada 24 horas após a administração. Além disso, o tratamento por período de várias semanas gera diversos efeitos adversos de pele, neurológicos endócrinos e imunológicos (CEAGLIO *et al.*, 2007). A proposta de partículas maiores, como as da amostra apresentada, é de justamente elevar a meia-vida do medicamento, reduzindo o número de aplicações no paciente, evitando o rebote viral já mencionado neste Trabalho e apresentando maior garantia da continuidade dos pacientes no tratamento.

Com relação ao tamanho do ativado maior que de seu conjugado, isso pode dever-se ao fato do álcool isopropílico preencher o centro ativo e expandi-lo formando pontes de hidrogênio. Com a molécula de interferon, tal expansão não ocorre, pois a proteína mais hidrofóbica não permite a entrada do solvente.

Nem sempre maior tamanho equivale a maior massa. O solvente pode interferir nesta determinação. No caso dos dois produtos peguilados a comparação pode ser realizada, pois estão na mesma condição e a massa maior corresponde ao maior tamanho.

Deve ser ressaltado, que esta foi a primeira determinação de tamanho de partícula para estes produtos. É necessário verificar se esta é a melhor técnica para esta determinação (com equipamento e solventes adequados), uma vez que não há referência na literatura. Ajustando e validando este método, pode ser de grande utilidade no controle de qualidade destes medicamentos, pois com a elevação da rigidez das Agências Regulatórias a presença dos isômeros de posição e aglomerados encontrados nas duas amostras peguiladas podem ser melhor identificados para que a qualidade e conhecimento do medicamento sejam ainda mais altos. O tamanho de partícula pode ser uma técnica de caracterização adicional para revelar elementos não detectados por perfil cromatográfico.

Quanto à forma do polietilenoglicol conjugado ao IFN- α 2b, o PegIntron é um conjugado covalente de IFN- α 2b ligado a uma cadeia linear de 12 kDa, enquanto o material produzido segundo a patente PI 0604313-5 é um conjugado de IFN- α 2b ligado à uma cadeia de PEG de 4 ramos, totalizando 48 kDa e na forma semelhante a um dendrímero, apresentada na Figura 8. Tal conformação pode permitir a encapsulação de uma molécula em sua estrutura (FARAJI e WIPF, 2009), o que otimiza a proposta de proteção do interferon ao centro deste PEG ativado de 4 ramos.

A nova estrutura proposta apresenta mais ramificações que o IFN- α 2a, Pegasys, apresentada pela Roche e que faz parte da lista de nanopartículas em sistemas de liberação controlada aprovados pelo FDA (FARAJI e WIPF, 2009). A presente estrutura de 4 ramos, se aprovada nas próximas etapas dos testes clínicos, poderá ser também considerada uma partícula em sistema de liberação controlada.

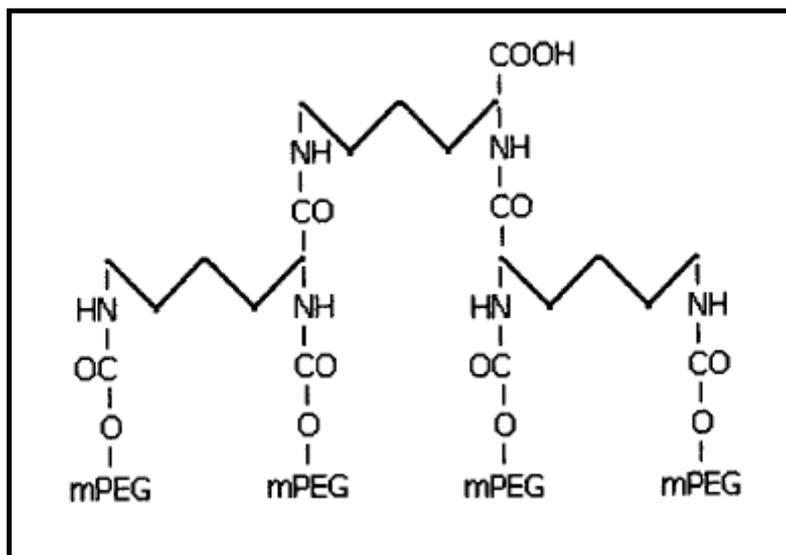


Figura 9: Ligante de PEG de 4 ramos com 48 kDa. Fonte: CIGB, 2006.

Sendo assim, o processo proposto para a obtenção do interferon peguilado utilizando PEG ativado de 48 kDa com estrutura semelhante a um dendrímero se apresenta como uma possibilidade de obtenção de um medicamento de liberação controlada para o tratamento da hepatite C.

Entretanto, deve-se ter em mente que o desafio em produzir conjugados está em selecionar o tamanho da cadeia, encontrando um equilíbrio ideal entre meia-vida e atividade antiviral. Peguilação excessiva pode reduzir a atividade de uma proteína, por interferência estérica, o que pode acarretar em doses mais elevadas do medicamento como compensação. Outro fator a ser levado em consideração é a capacidade do conjugado em reduzir o número de doses do medicamento ou concluir mais rapidamente a terapia a que se destina (CALICETI, 2004).

Pesquisa de outros processos de liberação controlada para o IFN- α também se encontram em estágios bem avançados, mas são processos que envolvem operações unitárias mais complexas e de difícil escalonamento. Podem ser uma alternativa para o futuro, pois o interferon é uma citocina de grande importância, não apenas para o tratamento das hepatites. No momento atual, para o controle das hepatites B e C crônicas no Brasil, é um grande passo a implementação do conjugado descrito neste Trabalho, com produção totalmente nacionalizada, atuando na distribuição para a população, com grande impacto na saúde pública do país.

6 CONCLUSÃO

- A molécula conjugada produzida em Bio-Manguinhos a partir do derivado PEG com 4 ramos e 48 kDa gera um produto de perfil similar por espectro de UV ao espectro do IFN- α 2b disponível no mercado;
- Os resultados de tamanho de partícula sugerem que a molécula conjugada produzida em Bio-Manguinhos apresenta maior tamanho que a molécula conjugada disponível no mercado e utilizada como comparação, mostrando que, em termos de aumento da meia vida pelo impedimento da eliminação renal, tem potencial de eficiência superior;
- O tamanho de partícula é um dado importante para medicamentos compostos por proteínas terapêuticas conjugadas à polímeros, uma vez que a relação entre forma e peso pode ser parâmetro para evitar a eliminação renal e identificar ainda a presença de isômeros de posição e outros elementos não detectados por perfil cromatográfico.

REFERÊNCIAS

ALBERS *et al.*, Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X. **Cerâmica**, v. 48, p. 34-37, 2002.

ANK, N. *et al.*, Lambda interferon (IFN- λ), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infection in vivo. **Journal of Virology**, v. 80, n. 9, p. 4501-4509, 2006.

ANVISA, Alerta SNVS/Anvisa/Ufarm nº 10, de 24 de dezembro de 2003. Alerta SNVS/Anvisa/Ufarm nº 10, de 24 de dezembro de 2003. **Alertas e Informes**. 2003. Disponível em

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/informetecnico!/ut/p/c4/04_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3hnd0cPE3MfAwMDMydnA093Uz8z00B_A3dTU_2CbEdFAEURpeg!/?WCM_PORTLET=PC_7_CGAH47L00G1870I8G5FBUC30V1_WCM&WCM_GLOBAL_CONTEXT=/wps/wcm/connect/anvisa/anvisa/pos+comercializacao+pos+uso/farmacovigilancia/alertas+por+regiao+geografica/nacionais/05_farm_nac_anos_anteriores/20031224+010> Acessado em 10 ago, 2010.

_____, Informe sobre o uso de Interferon Alfa 2a e Alfa 2b para o tratamento de Hepatites B e C. **Informes Técnicos**. 2005. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/2005/160905.htm>>. Acessado em 09 ago, 2010.

AZEREDO, H., Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.

BARONE, A. Hepatite por VHC – aspectos virológicos e suas implicações práticas. In **I Consenso da Sociedade Brasileira de Infectologia para o manuseio e terapia da hepatite C**, São Paulo: Ed. Office Editora e Publicidade. 2008 p. 20-23.

BEZERRA, C. A.; OLIVEIRA, J. S., Comparação do interferon alfa convencional com o interferon alfa peguilado no tratamento de pacientes com hepatite C crônica. **ConScientiae Saúde**, v. 6, n. 1, p. 19-28, 2007.

BHOPALE, G.; NANDA, R., Emerging drugs for chronic hepatitis C. **Hepatology Research**, v. 32, p. 46-153, 2005.

BILLIAU, A., Interferon: the pathways of discovery I. Molecular and cellular aspects. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 17, p. 381-409, 2006.

BLAIRE, L. *et al.*, Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon- α fusion protein in cynomolgus monkeys. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 303, n. 2, p. 540-548, 2002.

BRASIL, Portaria nº 34, de 28 de setembro de 2007. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 09 out. 2007, seção 1, p. 60-63.

_____. Ministério da Saúde, Boletim epidemiológico – Hepatites virais (versão preliminar), **Secretaria de Vigilância em Saúde**, Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais, 2010. Disponível na internet em <http://www.aids.gov.br/data/documents/storedDocuments/%7BB8EF5DAF-23AE-4891-AD36-1903553A3174%7D/%7BDA55BBF3-23FB-4581-B063-325701D4D949%7D/Boletim_hepatites_2010.pdf> Acessado em 09 ago, 2010.

_____, **Portaria nº 2080/GM – 31 de outubro de 2003**. Disponível da internet em <http://hepato.com/p_leis_direitos/Pportaria2080.htm>. Acesso em 12 jan., 2010.

_____, **Hepatites em foco**, sem data. Disponível da internet em <http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=18044> Acesso em 10 jan. 2010.

_____, **Hepatites virais: o Brasil está atento**. 2a ed, Brasília, DF, 2005.

_____, Secretaria de Vigilância em Saúde, **Nota técnica nº 13/2008/PNHV/DEVEP/SVS/MS**, 29 jan., 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_hepatites.pdf>. Acesso em 11 mar., 2009.

CALICETI, P., Pharmacokinetics of pegylated interferons: what is misleading? **Digestive and Liver Disease**, v. 36, supl. 3, p. S334-S339, 2004

CAMPOS, V., **Estudo da potencialidade de ácidos aminados encapsulados em nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona para uso na eletroterapia do câncer**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, 2008.

CHEVALIEZ, S. ; PAWLOTSKY, J-M. Interferon-based therapy of hepatitis C. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n. 59, p. 1222-1241, 2007.

CIGB. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (Cuba). HERNANDEZ, J. *et al.*, **Estrutura polimérica semelhante a dendrímero para a produção de conjugados de interesse farmacêutico**. PI 0604313-5 A, 30 jan. 2006.

CINDRIC, M. et al., Evaluation of recombinant human interferon α -2b structure and stability by in gel tryptic digestion, H/D exchange and mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 781-787, 2006.

CLINICALTRIALS.GOV, **Understanding clinical trials**, 2007. Disponível em: <<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/info/understand>>. Acesso em 11 set, 2010.

CREIGHTON, T. E. (Ed.). **Protein structure – a practical approach**. New York: IRL Press, 1995.

DELL VALLE, E. M., Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**. Article in press, 2003.

DIEPOLDER, H, New insights into the immunopathogenesis of chronic hepatitis C. **Antiviral Research**, v. 82, p. 103-109, 2009.

EMA, **European Public Assessment Reports (EPARs)**. Disponível na internet em
<http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=/pages/medicines/landing/epar_search.jsp&murl=menus/medicines/medicines.jsp&mid=WC0b01ac058001d124&source=homeMedSearch> Acessado em 07 ago. 2010.

F. HOFFMAN-LA ROCHE AG, Suíça. Bailon, P. e Palleroni, A., **Interferon conjugates**, patente EP 0 809 996 B1, 02 abril 2003.

FARAJI, A., WIPF, P., Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 2950-2962, 2009.

FDA, Search results for 'Interferon', **Drugs@FDA**. Disponível na internet em
<<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm>> Acessado em 07 ago. 2010.

FERREIRA, C. T.; SILVEIRA, T. R., Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 4, p. 473-487, 2004.

FLORENZANO, F., Perspectivas atuais para a obtenção controlada de polímeros e sua caracterização. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 18, n. 2, p. 100-105, 2008.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, Alfainterferona 2b humana recombinante, **Bio-Manguinhos**, bula do medicamento. Sem data. Disponível na internet em <http://www.fiocruz.br/bio/media/bulas/biofarmacos/BM_BUL_008_01_B_190528_Alfaln.pdf> Acesso em 01 mar. 2009.

HELD, D. e KILZ, P., Tips & Tricks: GPC/SEC How to choose a static light-scattering technique for molar mass determination. **The Column**, abr 2009.

Disponível em:

<http://www.polymer.de/fileadmin/custom_documents/Tips_Tricks_How_to_choose_a_LS_Technique_TheColumn0409.pdf>. Acesso em 27 jan. 2010.

HERMANSON, G. T., **Bioconjugate techniques**. 2 ed. London, UK: Elsevier, 2008.

HERNANDEZ, J. R. *et al.* Estudio comparativo mediante diferentes soluciones para eluir el interferon alfa recombinante de una columna de inunoafinidad. **Biotechnologia Aplicada**, v.15, n. 1, p.30-33, 1998.

HUMAN GENOME SCIENCES, Human Genome Sciences announces FDA is unlikely to approve albumin interferon once every 2 weeks, **HIVANDHEPATITIS.COM**, 22 jun. 2010. Disponível na internet em:
<http://www.hivandhepatitis.com/hep_c/news/2010/0622_2010_a.html> Acesso em 30 jul. 2010.

HUANG, Y. *et al.*, Preparation and characterization of a potent, long-lasting recombinant human serum albumin-interferon- α 2b fusion protein expressed in *Pichia pastoris*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, p. 301-308, 2007.

ICH, International Conference on Harmonization, **Pharmaceutical development Q8 (R2)**, ago. 2009. Disponível na internet em:
<<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA4986.pdf>>. Acesso em 03 fev. 2010.

KAYSER, et al, **Medical Microbiology**. 2 ed. Stuttgart-New York: Thieme, 2005.

KOZLOWSKI, A.; HARRIS, J., Improvements in protein PEGylation: pegylated interferons for treatment of hepatitis C. **Journal of Controlled Release**, v. 72, p. 217-224, 2001.

LUNA, E. J. A. *et al*, Eficácia e segurança da vacina brasileira contra hepatite B em recém nascidos. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, p. 1014-1020, 2009.

MACHADO, L.; GNOATTO, S.; KLÜPPEL, M., Lipossomas aplicados em farmacologia: uma revisão da literatura. **Estud. Biol.**, v. 29, p. 215-224, abr./jun. 2007.

MEYERS, C. M. *et al.*, Hepatitis C and renal disease : an uptodate. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 42, n. 4, p. 631-657, 2003.

MOHL, S.; WINTER, G., Continuous release of rh-interferon α -2a from triglyceride matrices. **Journal of Controlled Release**, v. 97, p. 67-78, 2004.

MONFARDINI, C. *et al.*, A branched monomethoxypoly(ethylene glycol) for protein modification. **Bioconjugate Chem.**, v. 6, p. 62-69, 1995.

PAWLOTSKY, J-M, Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. **Clinics in Liver Disease**, v. 7, p. 45-66, 2003.

PAWLOTSKY, J-M, Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 96-102, 2004.

PDB, Protein Data Bank, **Recombinant human interferon-alpha 2b**, 1997.
Disponível na internet em:
<<http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1RH2>>. Acesso em 13 jul. 2009.

PERONE *et al.*, Alta prevalencia do genótipo 1 em portadores de hepatite C crônica em Belo Horizonte, MG. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 238-242, 2008.

PORTO-ESPINOZA, L. P., et al., Mecanismos de evasión inmunitaria del virus de hepatitis C. Revisión. **Investigación Clínica**. v. 47, n. 1, p. 70-82, 2006.

QUIJANO, A. S.; OTERO, E. L., Tratamiento de las hepatitis víricas II. Tratamiento de la hepatitis crónica C. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 24, n. 8, p. 518-526, 2006.

RADHAKRISHNAN, R. et al., Zinc mediated dimmer of human interferon- α_{2b} revealed by X-ray crystallography. **Structure**, v. 4, p. 1453-1463, 1996.

RAMON, J. et al., PEGylated iinterferon- α 2b : a branched 40 k polyethylene glicol derivative. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 8, p. 1374-1386, 2005.

ROBERTS, M. J.; BENTLEY, M. D.; HARRIS, J. M., Chemistry for peptide and protein PEGylation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n. 54, p. 459-476, 2002.

ROCCO, P. R. M. *et al*, LASSBio-596 : da descoberta aos ensaios pré-clínicos. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 10-27, 2010. Disponível na internet em < <http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/view/74/118>> Acesso em 10, set 2010.

ROVERE, J. *et al.*, Caracterização morfológica do poliestireno de alto impacto. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 18, n. 1, p 12-19, 2008.

SAEZ, V. *et al*, Microencapsulation of recombinant interferon α -2b into poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. **Biotecnologia Aplicada**, v. 25, n. 1, p. 31-41, 2008.

SAEZ, V., RAMÓN, J.; PENICHE, C., Microspheres as delivery systems for the controlled release of peptides and proteins. **Biotecnología Aplicada**, v. 24, n. 2, p. 108-116, 2007.

SHEN, C. *et al.*, **Pegylated interferon alpha-1b**, patente US 0029573 A1, 09 fev, 2006.

SILVA, M. *et al.*, Physicochemical and biological assays for quality control os biopharmaceuticals : interferon alfa-2 case study. **Biologicals**, v. 36, p. 383-392, 2008.

SILVA, P.; LIMA, B.; SILVA, F.; Hepatite aguda por vírus A, B, C, D, E e G. **DST – J bras Doenças Sex Transm.**, v. 15, n. 2, p. 48-56, 2003.

SCINTAG, Chapter 7: **Basics of X-ray diffraction** Disponível na internet em: <<http://epswww.unm.edu/xrd/xrdbasics.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2010.

STRAUSS, E, Hepatite C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 1, p. 69-82, jan-fev. 2001.

TELLINGHUISEN, T., et al., Studying hepatitis C virus: making the best of a bad virus. **Journal of Virology**, v. 81, n. 17, p. 8853-8867, 2007.

THE C. EVERETT KOOP INSTITUTE, **Hepatitis C**. The hepatitis C virus, somente il. Sem data Disponível na internet em: <<http://www.epidemic.org/theFacts/hepatitisC/hepatitisC.php>> Acesso em 31 jul. 2009.

THITINAN, S.; McCONVILLE, J., Interferon alpha delivery systems for the treatment of hepatitis C. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 369, p. 121-135, 2009.

VBRC, Viral Bioinformatics Resource Center, **Hepatitis C virus database**, somente il. color. Sem data Disponível na internet em: <<http://www.hcvdb.org/index.asp?bhcp=1>> Acesso em 30 jun. 2009.

_____, **Information about hepatitis C vírus**, sem data. Disponível na internet em: <http://www.hcvdb.org/hcv_info.asp>. Acesso em 30 jun. 2009.

VERONESE, F.; HARRIS, J., Peptide and protein PEGylation III: advances in chemistry and clinical applications (preface). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 1-2, 2008.

_____.; PAUST, G., PEGylation, successful approach to drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 21, p. 1451-1457, 2005.

_____.; _____, PEGylation: posttranslational bioengineering of protein biotherapeutics. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 5, p. e57-e64, 2009.

VISO, A. Patogenia da hepatite C. In **I Consenso da Sociedade Brasileira de Infectologia para o manuseio e terapia da hepatite C**, São Paulo: Ed. Office Editora e Publicidade. 2008 p. 24-31.

WETZEL, R. *et al.*, Properties of a human alpha-interferon purified from *E. coli* extracts. **Journal of Interferon Research**, v. 1, n. 3, p. 381-390, 1981.

WHO, **Hepatitis B**, 2002. Disponível na internet em: <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB_whocdscsrlyo2002_2.pdf> Acesso em 03 out., 2009.

WHO, **Hepatitis C**, 2002. Disponível na internet em: <<http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/Hepc.pdf>>. Acesso em 03 out., 2009.

WU, H. *et al.*, Engineering considerations on modeling for pharmaceutical process analytical technology (PAT) application

YANG, L. *et al.*, A novel method to prepare highly encapsulated interferon- α -2b containing liposomes for intramuscular sustained release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, p. 9-15, 2006.

YOUNGSTER, S. *et al.*, Structure, biology, and therapeutic implications of pegylated interferon alpha-2b. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, p. 2139-2157.

ZHOU, S. *et al.*, Study on biodegradable microspheres containing recombinant interferon- α -2a. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, p. 1287-1292, 2002.